

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian - Albrechts - Universität zu Kiel

EINFLUSS VON AKTIVIERTEM RETINALEN PIGMENTEPITHEL AUF DIE ZYTOKINEXPRESSION VON MONOZYTEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian – Albrechts - Universität zu Kiel

vorgelegt von
SEBASTIAN WILKER
aus Georgsmarienhütte
Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf
Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.09.2017

gez.: Prof. Dr. Wolfram Klapper
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	4
 1 EINLEITUNG.....	7
1.1 ALTERSABHÄNGIGE MAKULADEGENERATION	7
1.2 DAS IMMUNPRIVILEG IM AUGE.....	9
1.3 DAS RETINALE PIGMENTEPITHEL.....	10
1.3.1 <i>Allgemeine Aufgaben</i>	10
1.3.2 <i>RPE und Immunregulation</i>	12
1.4 TLR3-REZEPTOREN	13
1.5 MONOZYTEN	15
1.6 ZYTOKINE	17
1.6.1 <i>Vorstellung der untersuchten Zytokine</i>	18
1.6.1.1 <i>TNF-α</i>	18
1.6.1.2 <i>Interleukin-1β</i>	20
1.6.1.3 <i>Interleukin-6</i>	21
1.6.1.4 <i>Interleukin-10</i>	21
1.7 ENZYME	22
1.7.1 <i>Vorstellung der untersuchten Enzyme</i>	23
1.7.1.1 <i>iNOS</i>	23
1.7.1.2 <i>COX2</i>	24
1.8 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	26
 2 MATERIALIEN UND METHODEN	26
2.1 MATERIALIEN	26
2.1.1 <i>Geräte</i>	26
2.1.2 <i>PC Software</i>	28
2.1.3 <i>Verbrauchsgegenstände</i>	28
2.1.4 <i>Chemikalien</i>	29
2.1.5 <i>Seren</i>	30

2.1.6	<i>Zellkulturmedien und -reagenzien, Rezepte</i>	31
2.1.7	<i>Enzyme</i>	32
2.1.8	<i>Immunstimulans</i>	32
2.1.9	<i>Antikörper</i>	32
2.1.10	<i>Nukleotide</i>	32
2.1.11	<i>Gene Expression Assays</i>	33
2.2	METHODEN	34
2.2.1	<i>Monozytenpräparation nach Berg et al.</i>	34
2.2.2	<i>Aufteilung der Monozyten auf Zellkulturflaschen</i>	36
2.2.3	<i>Bestimmung der Monozytenreinheit</i>	37
2.2.4	<i>Präparation von RPE-Zellen modifiziert nach Wiencke et al.</i>	38
2.2.5	<i>Aktivierung der RPE-Zellen und Zugabe der Überstände auf Monozyten</i>	40
2.2.6	<i>Trizolablösung nach Chomczynski et Sacchi</i>	41
2.2.7	<i>RNA Isolierung</i>	42
2.2.8	<i>Quantifizierung der extrahierten RNA</i>	42
2.2.9	<i>cDNA- Synthese</i>	43
2.2.10	<i>Realtime PCR</i>	43
2.2.11	<i>DNA- Quantifizierung</i>	44
2.2.12	<i>Statistische Auswertung der gemessenen Daten</i>	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	<i>MESSUNG DER MONOZYTENREINHEIT MITTELS DURCHFLUßZYTOMETRIE</i>	48
3.2	<i>ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR</i>	49
3.2.1	<i>TNF-α</i>	49
3.2.2	<i>Interleukin-1β</i>	49
3.2.3	<i>Interleukin-6</i>	50
3.2.4	<i>Interleukin-10</i>	51
3.2.5	<i>iNOS</i>	51
3.2.6	<i>COX2</i>	52
3.3	<i>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</i>	53

4	DISKUSSION	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	59
7	ANHANG.....	73
7.1	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	73
7.2	VERÖFFENTLICHUNGEN	74
7.2.1	<i>Kongressbeiträge.....</i>	<i>74</i>
7.2.2	<i>Artikel in Zeitschriften</i>	<i>74</i>
7.3	DANKSAGUNG	75
7.4	LEBENS LAUF	77

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR-2	Beta <i>chemokine receptor</i> 2 (entspr.: CD192)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase2
CNV	choroidale Neovaskularisation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FAM	Carboxyfluorescein
Fc-Rezeptor	<i>Fragment crystallisable</i> - Rezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
F2	<i>Filial generation 2</i>
g	Erdbeschleunigung
GMCSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HSP	Hitze Schock Proteine
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICE	Interleukin <i>Converting Enzyme</i>
IL	Interleukin

iNOS	induzierbare Stickstoffmonooxidsynthase
kDA	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine rich repeats</i>
MCP1	<i>Monocyte chemokine peptide 1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
PAMPs	<i>Pathogene associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEDF	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
PGE-2	Prostaglandin E2
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGHS-2	Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2
Poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC	<i>Sidescatter</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th1	Typ-1-Helfer(-zellen)
TIR	<i>Toll</i> IL-1-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min	Umdrehungen pro Minute

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

1 Einleitung

1.1 Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für Erblindung in der industrialisierten Welt. Die Ursachen für die Entwicklung einer AMD sind vielfältig, wobei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle zugesagt wird (1), (2). Den Hauptrisikofaktor stellt das Alter dar. Bei über 80-jährigen liegt die Inzidenz an einem Frühstadium der AMD zu erkranken bei über 30% (3). Gefäßveränderungen und damit verbundene hämodynamische Einschränkungen wie bei der Arteriosklerose, sowie Veränderungen im Immunsystem fördern den Krankheitsverlauf (4). Externe Risikofaktoren sind Rauchen und Übergewicht. Ebenfalls diskutierte Risikofaktoren sind ein bestehender Hypertonus, weibliches Geschlecht und eine hohe ernährungsbedingte Aufnahme an Fetten und Cholesterinen (3).

Man unterscheidet unterschiedliche Stadien der Makuladegeneration. Die Früh-Formen der AMD zeichnen sich durch extrazelluläre Ablagerungen, sogenannten Drusen an der Bruch'schen Membran, einer Grenzschicht zwischen Choroidea und retinalem Pigmentepithel (RPE) aus (5). Der genaue Zusammenhang zwischen der Formation von Drusen und einem Visusverlust ist noch nicht komplett aufgeklärt. Die Bestandteile der Drusen lassen jedoch vermuten, dass Entzündungsprozesse und die Aktivierung des Immunsystems eine entscheidende Rolle spielen. Neben Bestandteilen wie Phospho- und Glycolipiden, Kollagenen, Integrinen, Fibronectin und Beta-Amyloid konnten auch Plasmaproteine wie der Komplementfaktor C5, Alpha-1-Antytrypsin und Amyloid-P in Drusen identifiziert werden. Diese gehören zu den Akut-Phase-Proteinen und werden bei Entzündungen ausgeschüttet. Bestandteile wie Vitronectin, Komplementfaktor C5 und Apolipoprotein E sind mitverantwortlich für die Auslösung einer Immunantwort. Sowohl in den Drusen als auch im Zytoplasma der RPE-Zellen konnte Immunglobulin G nachgewiesen werden (6). Bestandteile des *membrane attack complex* (Komplementfaktoren C5-9) wurden an der Drusenoberfläche gefunden (6). Gegen Zellen gerichtete Angriffe des Komplementsystems führen häufig zu extrazellulären Ablagerungen von den zuvor endozytotisch aufgenommenen Immunkomplexen (7). Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, dass Immunreaktionen mitverantwortlich für die Formation von

Drusen sind.

Eine späte, trockene Form der AMD wird auch als Geographische Atrophie bezeichnet (siehe Kapitel 1.4, Absatz 3). Hier findet man Bereiche mit bereits apoptotischen Photorezeptoren und RPE-Zellen (8), (9). Eine weitere Spätform der AMD ist die feuchte oder auch exsudative AMD und geht mit einer choroidalen Neovaskularisierung (CNV) einher, bei der Kapillaren der Aderhaut in den subretinalen Raum und zwischen das retinale Pigmentepithel und die Photorezeptoren einwachsen. Die neugebildeten pathologischen Gefäße sind durchlässig und führen zu Flüssigkeitsaustritten ins Gewebe, retinalen oder subretinalen Ödemen, Blutungen oder Ablagerungen von Lipidexsudaten (3), (10). Entscheidender Wachstumsfaktor für die Gefäße ist das vom RPE basal zur Choriokapillaris sezernierte VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (7). Zusätzlich nimmt die physiologische Gefäßdichte im Alter ab und führt durch die dadurch herabgesetzte Gewebepерfusion und die entstehende Hypoxie zur Stimulation weiterer VEGF-Expression (11), (12), (13). Aktivierung des Komplementsystems, ablaufende Entzündungsreaktionen, Gefäßverletzungen und pro-inflammatorische Zytokine können zur erhöhten Ausschüttung von VEGF führen (14). Extrazelluläre Umbauprozesse und die bereits erwähnte Ausbildung von Drusen verbreitern die Diffusionsstrecke zwischen Choriokapillaris und RPE-Schicht. Der essentielle Stoffwechsel zwischen RPE und Choriokapillaris wird so gestört und resultiert zusätzlich in Hypoxie und der damit verbundenen weiteren Ausschüttung von VEGF aus dem RPE (15), (16). Auch Monozyten sind in der Lage VEGF auszuschütten und so zu einer choroidalen Neovaskularisation beizutragen (17), (18). Sie sezernieren aber zusätzlich eine Reihe weiterer Botenstoffe, sodass ihre Rolle im Rahmen der AMD aktuell kontrovers diskutiert wird (siehe Kapitel 1.5). Therapeutische Ansätze in der Behandlung der AMD wie zum Beispiel die intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren sind der momentane Goldstandard, können die Entwicklung der AMD jedoch nur verlangsamen. Die intravitreale Injektion von zum Beispiel Ranibizumab führt zu einer deutlichen Reduktion der Neovaskularisation (19). Eine effektive Bekämpfung der Ursache der Erkrankung existiert zum momentanen Zeitpunkt jedoch nicht.

1.2 Das Immunprivileg im Auge

Das Auge gehört zu den immunprivilegierten Bereichen des menschlichen Körpers. Dieses Immunprivileg beschreibt ein Phänomen, das ein verlängertes Überleben von histoinkompatiblen Geweben in gewissen Orten des Organismus ermöglicht (20), ohne dass eine Abwehrreaktion abläuft. Eine Haupteigenschaft des Immunprivilegs im Auge besteht darin, T-Zellen den Zugang zu diesen immunprivilegierten Bereichen zu verwehren (21). Überschießende Entzündungsreaktionen im Rahmen einer T-Zell Antwort können verheerende Schäden verursachen. Als anatomische Besonderheit dient die hämato-okuläre Barriere, die sogenannte Blut-Retina-Schranke dazu, den unkontrollierten Übertritt von Entzündungsmediatoren und Immunzellen aus dem Blut in Strukturen des Auges zu verhindern. Immunprozesse finden im Auge zwar statt, jedoch bedingt durch die anatomischen und physiologischen Besonderheiten auf einem Niveau, auf dem ein Begleitschaden (*bystander effect*) so klein wie möglich gehalten wird. Eine unkontrollierte Entzündungsreaktion mit möglichen Schädigungen für das umgebene Gewebe wird so verhindert. Zunächst ging man davon aus, dass im Rahmen dieses Immunprivilegs Leukozyten der Zugang zu diesen spezialisierten Bereichen komplett unmöglich wäre. Tatsächlich hat sich jedoch gezeigt, dass nicht der vollkommene Ausschluss von Immunzellen, sondern vielmehr lokale aktive Mechanismen der Immunregulation zur Aufrechterhaltung des stabilen Milieus von Nöten sind. Dazu gehören unter anderem eine reduzierte Expression der MHC-Oberflächenmoleküle (*Major histocompatibility complex*, siehe Kapitel 1.3.2) und die Ausschüttung vieler anti-inflammatorischer Faktoren, die sowohl an Zellen gebunden als auch gelöst vorkommen und so die Aktivität einwandernder Immunzellen modulieren. Insbesondere Makrophagen wird hierbei eine neuroprotektive und anti-inflammatorische Funktion zugewiesen (22). Ihre Rolle wird jedoch kontrovers diskutiert, da Makrophagen auch mit entzündungsförderndem Phänotyp auftreten (23), (24) (siehe Kapitel 1.5).

Das Privileg des Auges besteht darin, selektive Immunprozesse zuzulassen und überschießende Reaktionen und Zellinvasionen zu verhindern. Ein Versagen dieses Systems kann zur Entstehung von Krankheiten führen. In histo-pathologischen Proben von Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration konnten Zellen des Immunsystems wie mehrkernige Riesenzellen, Zellen des Mononukleären-

Phagozytose-Systeme und Mikrogliazellen mit erhöhter Immunreaktivität nachgewiesen werden. Infektionen können in diesem Zusammenhang ein Trigger der Immunreaktion sein, aber auch Autoantikörper scheinen nicht unbeteiligt zu sein (4). Das retinale Pigmentepithel (siehe Kapitel 1.3) mit seinen *pathogen associated molecular patterns (PAMP's)*, den sogenannten *Toll-like-Rezeptoren* (siehe Kapitel 1.4), steht in der Diskussion, einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung oder Modulation einer Immunreaktion zu leisten. Neben vielen wichtigen weiteren Funktionen trägt es mit seiner anatomischen Position zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs bei. Andererseits sezerniert es aber auch eine Reihe von Zytokinen und Botenstoffen, die zu Zellinteraktionen und Immunreaktionen beitragen und ist so auch im Krankheitsverlauf der AMD beteiligt (25).

1.3 Das retinale Pigmentepithel

1.3.1 Allgemeine Aufgaben

Das retinale Pigmentepithel (RPE) besteht aus einem einschichtigen Zellverbund zwischen der stark vaskularisierten Aderhaut und Retina (siehe Abbildung 1). Es hat keine photorezeptiven oder neuronalen Funktionen, ist aber für den Metabolismus der Photorezeptoren von großer Bedeutung.

Im Zellinneren befinden sich Melanin-Granula, die dem Pigmentepithel seinen Namen geben. Es handelt sich um polare, kuboide Zellen. Der apikale Pol weist in Richtung Photorezeptoren, basolateral grenzt es an die Bruch'sche Membran. Diese stellt eine Grenzschicht zwischen dem RPE und der darunterliegenden Choriokapillaris dar. Sie dient als strukturelle Unterstützung für das umgebende Gewebe und ist für Sauerstoff und Nährstoffe durchlässig, sodass diese aus dem Blut in das RPE diffundieren können. Mit zunehmendem Alter nimmt in der Bruch'schen Membran die Durchlässigkeit der Kollagenschichten ab und durch die Einlagerung von Lipiden kann der Stoffaustausch erheblich behindert werden. Zusammen mit dem Endothel der retinalen Blutgefäße bildet das RPE die Blut-Retina-Schranke (3). Das RPE sorgt für den kontrollierten Nährstofftransport aus dem Blut zu den Photorezeptoren und für den Abtransport der Metabolite in die entgegengesetzte Richtung.

Es phagozytiert die alten Membranen der Photorezeptoraußensegmente (26) und baut diese in den Lysosomen soweit wie möglich ab. Die daraus entstehenden Lipofuszin-Granula werden im basalen Bereich der Zelle abgelagert und kumulieren dort über die Jahre. Dies kann die Zelle in ihrer Funktion beeinträchtigen. Die Bestandteile des Lipofuszins können phototoxische Wirkung haben und Apoptose induzieren (3).

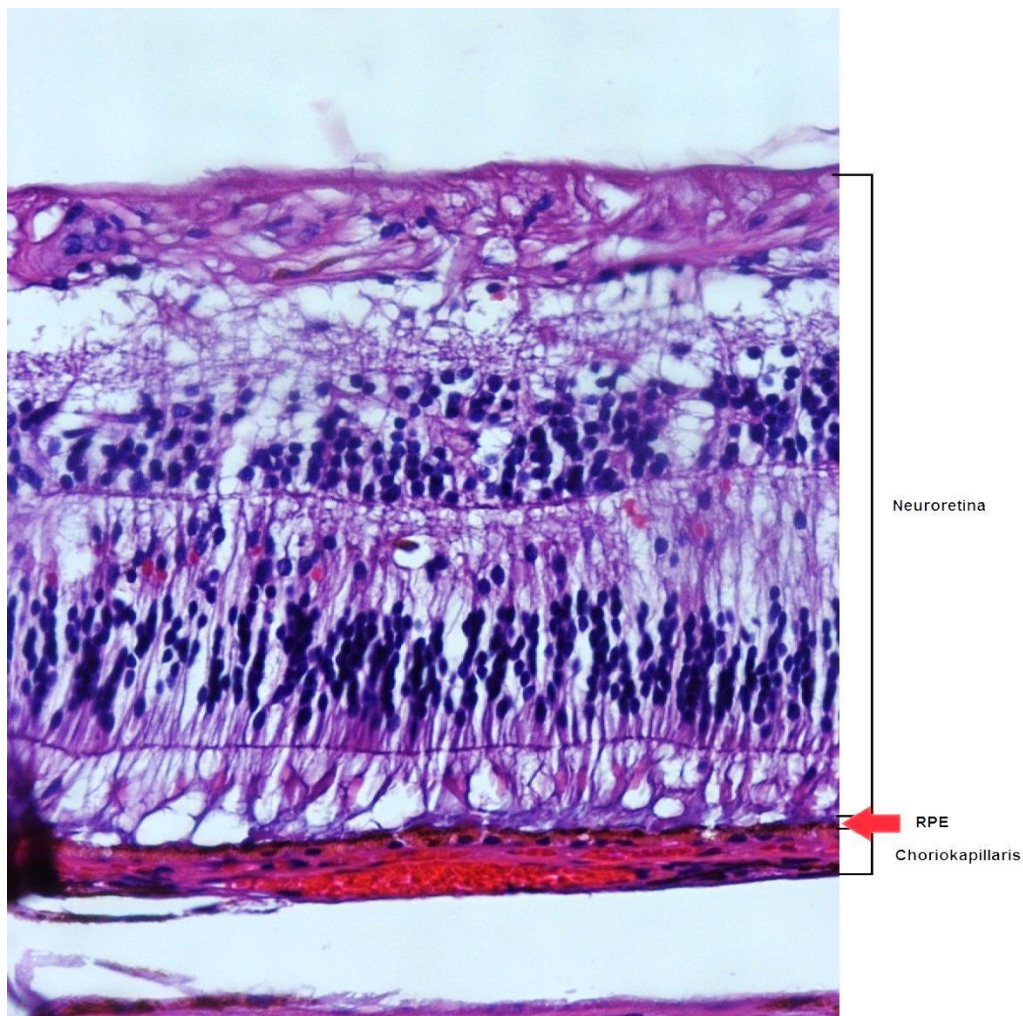


Abbildung 1: Histologischer Schnitt durch die Retina (Quelle: Labor der Augenklinik am Universitätsklinikum Kiel)

Um Flüssigkeitsansammlungen in der Netzhaut zu verhindern pumpt das RPE Flüssigkeiten aus dem subretinalen Raum in die Aderhaut. Wenn die RPE-Schicht durch neugebildete Gefäße wie bei der choroidalen Neovaskularisierung durchbrochen wird, ist diese Pumpfunktion gestört. Zur Aufrechterhaltung der

strukturellen Integrität sowohl der Photorezeptoren, als auch des Endothels der Choriocapillaris sezerniert das RPE Wachstumsfaktoren (7), (27). Viele Krankheiten, wie z.B. die altersabhängige Makuladegeneration stehen in Zusammenhang mit einem geschädigten oder atrophierten Pigmentepithel (28). Dabei zeigen sowohl die Photorezeptoren, als auch die RPE-Zellen und die Choriokapillaris atrophische Umbauprozesse, die zu einem völligen Funktionsverlust und der damit verbundenen Visusminderung führen (3). (29)

1.3.2 RPE und Immunregulation

Eine wichtige Aufgabe des RPE ist die Unterdrückung einer T-Zell Antwort in der Retina. Diese immunmodulatorischen Prozesse führen zu geringerer oder sogar völlig ausbleibender T-Zell-Aktivierung und regulieren eine mögliche Entzündungsreaktion um einen Begleitschaden für das Gewebe so gering wie möglich zu halten. Des Weiteren ist das RPE an der Regulation des Komplementsystems beteiligt. Es sezerniert den Komplement Faktor H in den subretinalen Raum und hemmt damit die Aktivierung des alternativen Pfades der Komplementkaskade (30). Für die Zell-Interaktion verfügt das RPE über eine breite Ausstattung mit Zytokinen, Chemokinen und den bereits erwähnten Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz zur erwähnten immunsuppressiven Eigenschaft kann das RPE nach Aktivierung aber auch pro-inflammatorische Zytokine exprimieren (31). Diese Aktivierung geschieht über spezialisierte Rezeptoren (*Toll-like*-Rezeptoren, (TLR) siehe Kapitel 1.4), die unterschiedliche Pathogene erkennen können. Durch seine anatomische Position im Auge ist das RPE eine erste Abwehrlinie gegen Pathogene (32), (33). Virusinfektionen können zum Beispiel über TLR3-Rezeptoren erkannt und bekämpft werden, bei unkontrolliertem Ablauf in einem gestörten immunologischen Gleichgewicht aber auch eventuell zum Fortschreiten chronischer Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration beitragen (34). Im Krankheitsbild der autoimmunen Uveitis ist zum Beispiel das Immunprivileg durch die Immigration von T-Zellen und die Interaktion mit dem RPE gestört und die damit verbundene Entzündungsreaktion ein pathologischer Mechanismus in der Entwicklung der Uveitis (35). Dabei induziert die Aktivierung des TLR3-Rezeptors im RPE die Ausbildung von MHCII-Molekülen (36), (37). Die

erhöhte MHCII Expression resultiert nun in einem stimulierenden Effekt auf die T-Lymphozyten (35). Dies zeigt im Gegensatz zur immunsuppressiven Wirkung im gesunden Auge mit intaktem Immunprivileg einen möglichen Zusammenhang zwischen TLR3-Aktivierung und Entwicklung von entzündlichen Erkrankungen im Auge. Da im intakten Auge das RPE durch die Bruch'sche Membran nicht in direktem Kontakt zu den Blutzellen kommen kann, muss die Zellinteraktion auf der Sekretion von Botenstoffen beruhen (38). Über die Ausschüttung von *monocyte-chemotactic-peptide 1* (MCP1) werden zusätzlich Monozyten angelockt, die im Rahmen einer Entzündung entscheidend mitwirken können (siehe Kapitel 1.5).

1.4 TLR3-Rezeptoren

Die Zellen des RPE exprimieren sowohl im Zellinneren als auch auf der Oberfläche sogenannte *Toll-like-Rezeptoren* (TLR). Diese sind Komponenten des angeborenen Immunsystems und gehören zu einer Familie von Rezeptoren, die *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen (39). TLR finden sich außerdem auf Antigen-präsentierenden Zellen und auf Zellen in anatomischen Positionen, an denen der Körper direkt mit der Umwelt in Kontakt tritt, wie epitheliale Zellen der Haut, des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege oder des Urogenitaltraktes (40). Strukturell handelt es sich um Transmembranproteine mit einer extrazellulären Domäne zur Erkennung der Liganden und einem intrazellulären Teil, der die Signalkaskade weiterleitet (41). Eine Aktivierung führt letztendlich zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern und der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und Interleukin-1 (41), mit der Folge einer weiteren Rekrutierung von Leukozyten. Auf dendritischen Zellen mit ihrer Hauptfunktion der Antigen-Präsentation führt die Aktivierung der TLR zur Zellreifung und der damit verbundenen Produktion von Zytokinen und einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen. Aktuell sind zehn verschiedene TLR bekannt. Jeder Rezeptor ist in der Lage spezifische Muster bzw. bestimmte Molekülstrukturen zu erkennen.

TLR4 erkennt das Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien, mehrere virale Bestandteile, sowie nach Gewebsverletzungen freiwerdende Substanzen (41). Außerdem ist er Teil im Prozess der Phagozytose von Photorezeptoraussensegmenten durch das RPE (42). Zusammen mit TLR1 und

TLR6 erkennt TLR2 Lipoproteine von gram-positiven Bakterien, Mykoplasmen und Spirochäten. Das Flagellin, das manchen Bakterien zur Fortbewegung und Adhäsion an Zellen dient, wird durch TLR5 erkannt. TLR9 ist spezialisiert auf bakterielle DNA. Die Liganden der *Toll-like*-Rezeptoren 7 und 8 sind bis jetzt noch nicht bekannt, scheinen aber bei der Erkennung der Nukleinsäuren von Mikroorganismen mitzuwirken.

RPE-Zellen exprimieren die TL-Rezeptoren 1-7, 9 und 10, wobei TLR3 die höchsten Expressionsraten aufweist (40). Der TLR3 Rezeptor ist ein intrazellulär liegender, auf den Endosomen lokalisierter Rezeptor bestehend aus 904 Aminosäuren (43), (44). Als Typ-1-Transmembran-Rezeptor-Protein besteht TLR3 aus einem außenliegenden Teil aus LRRs (*leucine rich repeats*), einer Transmembrandomäne gebildet durch eine α -Helix und einem zytoplasmatischen Teil, der die TIR (*Toll/IL-R*) Domäne enthält (44). Über diese TIR Domäne findet über Adaptorproteine die Weiterleitung der Signalkaskade statt. Ligand des TLR3 ist doppelsträngige RNA (dsRNA). DsRNA wird im Replikationszyklus von Viren produziert und führt zu einer Typ-1-Interferon Antwort und unterstützt die Reifung dendritischer Zellen (41). Es entsteht aber auch in Folge des Zelltods, sodass der Tod anderer Zellen zu einer TLR3-Aktivierung führen kann (45). TLR3 kann, um eine virale Infektion zu imitieren, spezifisch durch synthetisches Poly I:C aktiviert werden (46). Im Rahmen einer viralen Infektion führt die Aktivierung des TLR-3-Rezeptors zur Induktion einer antimikrobiellen Immunantwort. Diese Immunantwort besteht aus einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und Typ-1-Interferonen sowie der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IL-12 (47). Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt eine Reifung und Differenzierung dendritischer Zellen (46), kann aber auch in Abhängigkeit von der intrazellulären Signaltransduktion zur Induktion von Apoptose führen (44).

Die Aktivierung des TLR3-Rezeptors ist möglicherweise am Krankheitsbild der geographischen Atrophie, der letzten Stufe der trockenen AMD, beteiligt (8). Dabei kommt es zu einem Abbau und Zerfall des retinalen Pigmentepithels als mögliche Folge eines TLR3 vermittelten Zelltodes. Darüber hinaus konnten aber auch TLR3 Polymorphismen ermittelt werden, die einen protektiven Effekt auf die Ausbildung einer geographischen Atrophie haben (8). Die Behandlung mit einem Anti-TLR3

Antikörper konnte die durch Poly I:C vermittelte Rate an Apoptose im Modell jedoch wiederum reduzieren (33). Des Weiteren führt die Aktivierung des TLR3 Rezeptors in RPE Zellen zu einer erhöhten VEGF Ausschüttung (33). Dies kann zum einen Teil einer möglichen Überlebensstrategie der RPE Zellen sein, da ein protektiver Einfluss von VEGF auf RPE Zellen bereits beschrieben ist (48), andererseits ist der Prozess der Neovaskularisation fest mit der Ausschüttung von VEGF verknüpft. Mitverantwortlich für die unterschiedlichen Konsequenzen einer TLR3 Aktivierung sind die *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (49). In diesem Zusammenhang konnte ein möglicher protektiver Effekt dieser Kinasen in Bezug auf den TLR3 vermittelten Zelltod gezeigt werden (33). Außerdem führt die TLR3 Aktivierung in Zellen des RPE zur Ausschüttung von *monocyte-chemotactic-peptide 1* (MCP1) (47), wodurch Monozyten angelockt werden, die zusätzlich im Krankheitsprozess der altersabhängigen Makuladegeneration beteiligt zu sein scheinen (siehe Kapitel 1.5). Kumar et al. konnten zeigen, dass Monozyten selbst jedoch keine TLR3-Rezeptoren besitzen.

1.5 Monozyten

Monozyten gehören zum monozytären phagozytischen System. Als Zellen des angeborenen Immunsystems entwickeln sie sich im Knochenmark und verweilen nur wenige Tage im Blut, um sich dann außerhalb der Gefäße zu den unterschiedlichen Gewebsmakrophagen oder dendritischen Antigen präsentierenden Zellen zu differenzieren. Sie besitzen als einfacher Monozyt einen Durchmesser von etwa 10-11 µm. Im Rahmen ihrer Ausreifung kann sich die Zelle auf bis zu 80 µm vergrößern. Als Makrophagen liegt ihre Hauptaufgabe in der Phagozytose. Aber auch ihre sekretorische Fähigkeit bestimmt viele zelluläre Vorgänge. Komplementfaktoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite (H₂O₂, NO, NO₂), Arachidonsäurederivate, Enzyme und Enzyminhibitoren gehören zu den sekretorischen Substanzen.

Im Rahmen einer Entzündung besteht die wesentliche Aufgabe in der Phagozytose von Bakterien, Aktivierung von Adhäsionsmolekülen am Endothel und der Induktion der Angiogenese (50). Die Rolle der Monozyten im Prozess der AMD wird aktuell kontrovers diskutiert. Viele verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Monozyten

auf unterschiedliche Weise involviert sind. Sie können eine pro- oder anti-angiogenetische Rolle spielen und die choroidale Neovaskularisierung und damit das Fortschreiten einer AMD unterstützen, aber auch einen protektiven Faktor darstellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine herabgesetzte Monozytenzahl zu einem weniger schweren Verlauf der choroidalen Neovaskularisation führt (23). Zu einem gegenteiligen Ergebnis kommt die Arbeit von Apte et al. Eine vermehrte Makrophageninfiltration reduziert hier die Ausbildung der choroidalen Neovaskularisation, während durch eine herabgesetzte Einwanderung von Makrophagen in die Retina der anti-angiogene Effekt der Monozyten reduziert wird und die Gefäßneubildung voranschreitet (24).

In Geweben, die einer chronischen Entzündung unterliegen, etwa bei einer malignen Tumorerkrankung, stimulieren Makrophagen die Neovaskularisation und sorgen so für ein Tumorwachstum (51). Eine Verringerung der Makrophagenzahl durch eine gezielte medikamentöse Therapie führte hier zu einer weniger ausgeprägten, durch Interleukin-1- β ausgelösten Angiogenese.

Andererseits kann die Abwesenheit von Monozyten im Auge möglicherweise eine Neovaskularisation hervorrufen, was für eine anti-angiogene Wirkung der Monozyten spricht (52). Untersucht wurden dabei die Augen von *Knock-out*-Mäusen denen sowohl das *monocyte-chemoattractant-protein-1* (MCP1) als auch der entsprechende Rezeptor (CCR-2) fehlte. Dieser Mangel führte zu einer herabgesetzten Makrophagenmobilisation, da über MCP1 Monozyten rekrutiert werden. An diesen Augen konnten Veränderungen entsprechend denen der pathologischen Prozesse einer AMD festgestellt werden. Es zeigten sich subretinale Ablagerungen, eine verdickte Bruch'sche Membran, zerstörte Kollagen- und Elastin-Schichten und Ansammlungen von Lipofuscin-Granula. In der Kontrollgruppe mit Wild-Typ Mäusen konnte keine dieser Veränderungen festgestellt werden (52).

Welchen Einfluss Monozyten bzw. Makrophagen letztendlich auf die zellulären Prozesse haben, ist abhängig von ihrem Phänotyp (53). Sie sind in der Lage sich in unterschiedliche Makrophagentypen zu polarisieren. Dies ist wiederum abhängig von den unterschiedlichen Zytokinen und Chemokinen, die zuvor von anderen Zellen des Immunsystems ausgeschüttet wurden. Die Phänotypen lassen sich grob in einen sogenannten M1- und einen M2-Typen unterteilen. Die Differenzierung zum M1-

Makrophagen geschieht nach Ausschüttung von Interferon- γ , TNF- α und durch Lipopolysaccharide auf Bakterienoberflächen. Dieser klassische Makrophagen-Typ exprimiert den Fc-Rezeptor zur Opsonierung von Fremdpartikeln im Prozess der Phagozytose. M1-Makrophagen beinhalten die induzierbare NO-Synthase, und charakterisieren sich durch die Ausschüttung von hohen Interleukin-12 Raten aber niedriger anti-inflammatorischer Interleukin-10 Produktionen. M1-Makrophagen sind Teil einer Th-1-Antwort, die zu einer Entzündungsreaktion mit Abtötung von Mikroorganismen und Tumorzellen und einer hohen Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 und Interleukin-6 führt.

Werden Makrophagen Immunkomplexen und LPS ausgesetzt, polarisieren sie sich zum M2-Typen. Dieser ist charakterisiert durch hohe Interleukin-10-Raten und niedrige Interleukin-12 Konzentrationen. Insgesamt zeichnet sich der M2-Makrophage durch einen anti-inflammatorischen aber pro-angiogenen Phänotypen aus. Die M2-Makrophagen können durch unterschiedliche Stimuli in weitere drei Unterformen (M2a, M2b, M2c) ausreifen. Der M2a-Typ ist mitverantwortlich für eine Th-2 Antwort, wodurch pro-inflammatorische Th-1-Zellen gehemmt werden. M2b-Makrophagen besitzen ebenfalls entzündungshemmende und immunregulative Eigenschaften. Der M2c-Typ unterstützt das Gewebe-*Remodelling* (53). Die Entwicklung von einfachen Monozyten in Richtung des klassischen M1-Typen wird von M2-Makrophagen verhindert (53). In Bezug auf die altersabhängige Makuladegeneration haben eine Reihe von Arbeiten bewiesen, dass Monozyten mit pro-angiogenem Phänotypen an der choroidalen Neovaskularisation involviert sind (17), (18). Monozyten produzieren VEGF und induzieren auch in RPE-Zellen die Bildung dieses Wachstumsfaktors (18). Diese Tatsache macht deutlich, dass der Zellkontakt zwischen Monozyten und RPE pathologische Folgen haben kann. Im gesunden Auge besteht kein direkter Kontakt zwischen diesen Zellen. Der humorale Kontakt zwischen RPE und Monozyten führt zur Ausreifung und Differenzierung von Monozyten (54). (55)

1.6 Zytokine

An der Aufrechterhaltung einer effektiven Abwehr gegenüber Krankheitserregern und möglichen Organismus schädigenden Substanzen ist eine Vielzahl unterschiedlicher

Zellen beteiligt. Das Zusammenspiel mehrerer Zellarten setzt ein funktionierendes Kommunikationssystem voraus. Wichtige Vertreter in diesem System sind die Zytokine. Diese sind von Zellen sezernierte Proteine mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ca. 25 kDA (56). Von diesen Proteinen sind bisher mehr als 100 bekannt, die sich in verschiedene Untergruppen einteilen lassen. Eine Reihe dieser Zytokine sind an Entzündungsprozessen beteiligt, während eine andere Gruppe wiederum eine große Rolle bei der Zelldifferenzierung spielt. Die Einteilung in Untergruppen stellt sich jedoch komplexer dar, weil einzelne Zytokine mehrere Funktionen übernehmen können. Dieses Phänomen bezeichnet man als Pleiotropie (56).

An der Produktion der einzelnen Botenstoffe sind verschiedene Zellen des Immunsystems beteiligt. Die Ausschüttung kann das Verhalten der Zelle selbst (autokrin) oder das Verhalten anderer beeinflussen. Die Wirkung eines Zytokins auf Zellen in nächster Umgebung wird als parakrin bezeichnet. Ähnlich der Wirkung von Hormonen (endokrin) kann aber auch eine weit im Körper entfernt befindliche Zelle das Wirkspektrum eines Zytokins erfahren (57). Um eine spezifische Reaktion hervorrufen zu können, bindet jedes Zytokin meist hochaffin an seinen spezifischen Rezeptor. So wie die Expression der Zytokine meist eine Immunantwort auf einen bestimmten Reiz darstellt, werden auch die spezifischen Zytokinrezeptoren nach Aktivierung der Zelle exprimiert bzw. hochreguliert (56), (57). Dies ermöglicht dem Immunsystem auf unterschiedliche Reize mit einer individuellen Immunantwort zu reagieren. Im Folgenden sollen die im Fokus dieser Arbeit stehenden Zytokine und Enzyme näher vorgestellt werden.

1.6.1 Vorstellung der untersuchten Zytokine

1.6.1.1 TNF- α

Der Tumornekrosefaktor- α verdankt seinen Namen der Entdeckung, dass dieses Protein in einem chemisch induzierten Tumor der Ratte eine Nekrose auslösen kann. Es wird als ein Transmembranprotein gebildet. Von diesem wird die reife Form durch eine Metalloproteinase abgespalten. TNF- α kommt in membrangebundener und löslicher Form vor. Es wird von sehr vielen Zellen gebildet; als Hauptproduzenten

gelten Monozyten und Makrophagen (58). Der Stimulus zur Ausschüttung dieses Zytokins ist oftmals eine mikrobielle Substanz oder ein Toxin von Viren, Bakterien oder Parasiten. Aber auch TNF- α selbst kann auslösender Faktor sein. TNF-Rezeptoren existieren auf fast jeder Zelle. Die zentrale Aufgabe des Zytokins liegt im Bereich der Immun- und Entzündungsreaktion. Es wird als Schlüsselenzym bezeichnet, da es im Rahmen akuter Entzündung zu Beginn ausgeschüttet wird und die Induktion weiterer Botenstoffe bewirkt. Über die Synthese von Prostaglandinen im Bereich des Hypothalamus ist es an der Entstehung von Fieber beteiligt. Die Wirkung auf Herz und Gefäße kann über eine verminderte Auswurfleistung und die Reduktion des Gefäßwiderstandes zu einem Blutdruckabfall führen. Am Endothel steigert es durch Veränderung der Zell-Zell Kontakte den Flüssigkeitsaustritt und kann durch Expression von Proteinen zur Bildung von lokalen Blutgerinnseln führen. Außerdem veranlasst es Makrophagen das Lumen der Blutgefäße zu verlassen (Diapedese) und sich an der Infektionsstelle zu sammeln. In der Leber führt die Expression von TNF- α zur Bildung von weiteren Akut-Phase Proteinen. Im Knochenmark wird die Bildung von Leukozyten angetrieben. (56) (57)

Neben diesem pleiotropen Wirkspektrum werden dem Tumornekrosefaktor-alpha auch anti-tumorale Eigenschaften zugesprochen. Über die Auslösung von Apoptose wirkt es direkt tumortoxisch. Es aktiviert Makrophagen, Natürliche-Killer-Zellen und zytotoxische T-Zellen und schädigt einerseits tumorversorgende Blutgefäße. (56) (57) Von Makrophagen produziert, hat TNF- α aber auch einen entscheidenden wachstumsfördernden Einfluss auf die Angiogenese, insbesondere im Prozess der choroidalen Neovaskularisation. TNF- α induziert hierbei die Ausschüttung von VEGF aus dem retinalen Pigmentepithel (59). TNF- α reduziert in RPE-Zellen außerdem die Produktion von Komplementfaktor-H. Daraus ergibt sich ein höheres Risiko für die Aktivierung des *membrane-attack-complex* zur Lyse von Zellen oder zur Bekämpfung von Mikroorganismen mit einem möglichen schädigenden Begleiteffekt auf das umgebende gesunde Gewebe (60). In einer weiteren Arbeit zeigte sich, dass Patienten mit einer erhöhten TNF- α Expression eine höhere Prävalenz für das Auftreten einer choroidalen Neovaskularisation aufwiesen (61).

1.6.1.2 Interleukin-1 β

Die Synthese des inaktiven IL1-Vorläuferproteins benötigt einen bestimmten Reiz, wie z.B. die Aktivierung der Zelle durch einen TLR-Rezeptor oder andere Zytokine wie z.B. TNF- α . Das *interleukin converting enzyme* (ICE) oder auch Caspase-1 genannt, bildet aus dem Vorläuferprotein die aktive Form des Interleukins. Die Hauptproduzenten des IL-1 β sind Monozyten und Makrophagen (62). Der spezifische Interleukin-Rezeptor kommt dagegen auf allen kernhaltigen Zellen vor. Das Wirkspektrum ist vergleichbar mit dem des zuvor beschriebenen TNF- α . Es ist ebenfalls eines der Schlüsselenzyme im Entzündungsprozess, wobei die Ausschüttung dieses Zytokins die Zellteilung von T-Lymphozyten induziert. Die Expression von MHCII auf Antigen präsentierenden Zellen wird erhöht und die Proliferation von B-Lymphozyten wird gesteigert, was indirekt zu einer vermehrten Antikörperproduktion führt. IL-1 β induziert außerdem die Expression anderer Zytokine wie TNF- α und Interleukin-6. Im Zusammenspiel mit diesen beiden Zytokinen ist es an der Auslösung der Akut-Phase-Reaktion beteiligt. Durch die Bildung von Prostaglandin-E2 wird die Körpertemperatur erhöht. Aktive Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) werden ebenfalls durch die Ausschüttung von IL-1 β vermehrt gebildet. Außerdem wird die Synthese von Matrix-Metalloproteasen angeregt, die wiederum lokales Gewebe abbauen, sodass weiteren Abwehrzellen der Zugang zum Infektionsherd erleichtert wird. IL-1 β hat des Weiteren Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunprozessen und chronischen Krankheitsverläufen, da es der stärkste Induktor von Th-17- Zellen ist, die für diese Prozesse mitverantwortlich sind. Neben diesem insgesamt katabolen Effekt ist IL-1 β aber auch an Reparaturmechanismen beteiligt. Es induziert Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und ist somit auch für die Wundheilung und Narbenbildung ein entscheidender Botenstoff. (56) (57)

Im Rahmen der diabetischen Retinopathie zeigen sich hohe IL-1 β Konzentrationen. Die Produzenten des Zytokins sind hierbei retinale Endothelzellen, Müller-Zellen und Astrozyten (63). Als eigentlicher Hauptproduzent des Interleukins scheinen auch Monozyten an der Aufrechterhaltung eines Entzündungsprozesses im Auge und der Entstehung von Erkrankungen wie der AMD beteiligt zu sein (51), (53), (17).

1.6.1.3 Interleukin-6

IL-6 ist ein Zytokin mit sehr weitem Wirkspektrum. Es wird von vielen Zellen des Immunsystems gebildet, u.a. von T-Lymphozyten und mononukleären Zellen.

Es wirkt als Wachstumsfaktor auf hämatopoetische Stammzellen und unterstützt die Reifung von Makrophagen und Thrombozyten. Zusammen mit TNF- α und IL-1 β ist es für die Akut-Phase-Reaktion in der Leber mitverantwortlich und wirkt ebenfalls als endogenes Pyrogen. Eine dadurch erhöhte Körpertemperatur lässt Krankheitserreger langsamer wachsen und verstärkt immunologische Reaktion wie T-Zell Proliferation, T-Zell-Aktivität und Antikörperproduktion (56), (64), (65). IL-6 unterstützt die Ausreifung von B-Lymphozyten zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und kann damit eine Immunantwort verstärken (57). Es beeinflusst die Differenzierung von T-Zellen, Makrophagen und vieler anderer Zellen (66). Außerdem ist IL-6 an der Entwicklung von chronischen Erkrankungen und in der Entstehung von Tumoren beteiligt (67). Als Unterstützer der Expression von VEGF-Rezeptoren hat IL-6 direkten Einfluss auf das Wachstum von Gefäßen (68). Als Biomarker für ablaufende Entzündungsreaktionen konnte zusammen mit anderen Infekt-Parameter wie zum Beispiel dem C-Reaktiven Protein bereits gezeigt werden, dass hohe IL-6 Raten mit dem Fortschreiten einer AMD assoziiert sind (69).

Neben diesen pro-inflammatorischen Eigenschaften kann IL-6 aber auch die Produktion von TNF- α in Makrophagen hemmen (56). Zusammen mit einer regulatorischen Funktion, die für die Balance zwischen pro-inflammatorischen Th-1- oder Th-17 Zellen und immunsuppressiv wirkenden regulatorischen T-Zellen sorgt (67), hat IL-6 somit auch entzündungshemmende Wirkung.

Wegen seiner Beteiligung an der Entwicklung vieler Krankheiten ist IL-6 ein bedeutendes Zielmolekül in der medikamentösen Therapie. Im chronischen Krankheitsprozess der autoimmunen rheumatoiden Arthritis konnte mit Hilfe von Tocilizumab als monoklonaler anti-IL-6-Rezeptor Antikörper ein Gelenkschaden reduziert und eine B-Zell Hyperaktivität gehemmt werden (70). (71)

1.6.1.4 Interleukin-10

IL-10 besitzt im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen pro-inflammatorischen Zytokinen überwiegend entzündungshemmende Eigenschaften. Monozyten und

Makrophagen gehören auch hier zu den Hauptproduzenten. TNF- α , IL-1 β und IL-6 können die Synthese von IL-10 induzieren, sodass Entzündungsreaktionen gestoppt werden (56). IL-10 selbst kann im Rahmen der Autoregulation seine eigene Synthese hemmen (72), aber auch die in dieser Arbeit nicht untersuchten Zytokine wie IL-4 und Interferon- γ können die Synthese herab regulieren. Seine entzündungshemmende Wirkung kommt durch die Inhibition der T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen zustande. In den T-Lymphozyten wird die Synthese von weiteren Botenstoffen unterdrückt. In Monozyten und Makrophagen führt die Ausschüttung von IL-10 dazu, dass pro-inflammatorische Zytokine, wie die oben beschriebenen TNF- α , IL-1 β und IL-6 weniger exprimiert werden (72). Zusätzlich fördert es die Synthese des IL-1-Rezeptorantagonisten, der ebenfalls entzündungshemmende Wirkung hat. Des Weiteren reduziert es die Bildung von Stickstoffmonoxid und reaktivem Sauerstoff (56). Neben diesem eindeutig anti-inflammatorischen Wirkspektrum ist IL-10 aber auch als Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten bekannt (56).

Apte et al. konnten in einer Arbeit mit Augen von Mäusen zeigen, dass die Herabregulation von IL-10 und damit einhergehende herabgesetzte Rekrutierung von Entzündungszellen, wie z. B. Makrophagen zu einer vermehrten choroidalen Neovaskularisation führt (24).

1.7 Enzyme

Enzyme sind wichtige Proteine, die essentiell für den Ablauf vieler Reaktionen eines Organismus sind. Sie binden mit ihrem aktiven Zentrum an Moleküle und sorgen für eine Absenkung der für eine Reaktion benötigten Aktivierungsenergie. So wird oftmals der Ablauf einer Reaktion, die bei normalen Temperaturen nicht stattfinden könnte, erst ermöglicht. Neben einer Absenkung der Aktivierungsenergie steigern Enzyme die Reaktionsgeschwindigkeit. Zusammengefasst wirken sie wie ein Katalysator. Dabei sind sie substratspezifisch und gehen unverändert aus einer Reaktion hervor. Für die vielfältigen Reaktionen im menschlichen Organismus gibt es eine Vielzahl an Enzymgruppen. In dieser Arbeit wurden eine Synthase und eine Oxygenase untersucht. Synthasen produzieren in einer anabolen Reaktion ihr Produkt aus mehreren kleineren Molekülen. Oxygenasen sind Enzyme, die im Reaktionsablauf ein oder mehrere Sauerstoffatome auf ihr Substrat übertragen. (73)

1.7.1 Vorstellung der untersuchten Enzyme

1.7.1.1 iNOS

Stickstoffmonoxid (NO) wird im menschlichen Organismus durch drei Enzyme synthetisiert. Die neuronale und die endotheliale NO-Synthase werden konstitutiv exprimiert. Die dritte Isoform dieser Synthasen stellt die induzierbare NO-Synthase (iNOS) dar. Sie wird nur auf bestimmte Stimuli exprimiert, wie zum Beispiel die Ausschüttung von Endotoxinen durch Bakterien oder durch den Einfluss von Zytokinen wie TNF- α oder IL-1.

Die induzierbare NO-Synthase wird unter anderem von Makrophagen, Mesangialzellen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen exprimiert. Im Gegensatz zur neuronalen und endothelialen NO-Synthase ist die Synthese von Stickstoffmonoxid durch die induzierbare NO-Synthase nicht kalziumabhängig.

Sobald die iNOS exprimiert wird, produziert sie unabhängig von einer Aktivierung durch intrazelluläres Kalzium eine NO-Menge, die um das Tausendfache höher liegen kann, als die Konzentrationen, die durch die konstitutiven NO-Synthasen erreicht werden (74). Stickstoffmonoxid ist ein freies Radikal, dass je nach Konzentration als molekularer Botenstoff wirken und unter anderem den Blutfluss regulieren, aber auch zytotoxische Wirkung zeigen kann (75). Insbesondere eine neurotoxische Wirkung des NO ist bereits beschrieben worden (76). In diesem Zusammenhang konnte der Einsatz von iNOS-Inhibitoren die iNOS-Aktivität in ischämischem neuronalen Gewebe abschwächen und einen durch zerebrale Ischämie hervorgerufenen Gewebeschaden reduzieren (77). Ähnliche Effekte wurden bei Mäusen mit Deletion des iNOS-Genes beschrieben (78).

An der glatten Gefäßmuskulatur hat NO eine relaxierende Wirkung durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und den damit verbundenen Konzentrationsabfall des intrazellulären Kalziums. NO hemmt außerdem die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten und die Ausschüttung von Proteinen, die an der Entstehung der Artherosklerose beteiligt sind. In diesem Zusammenhang verhindert NO auch eine Ausschüttung von MCP1 (*monocyte-chemotactic-peptide-1*) und unterdrückt so eine Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand (74). Zusammengefasst zeigt NO also eine gefäßprotektive Eigenschaft.

Zusätzlich ist NO ein wichtiger Faktor für die Angiogenese (79). Es konnte bereits

gezeigt werden, dass VEGF die Freisetzung von NO aus Endothelzellen stimuliert und die Expression von NO-Synthasen erhöht (80), (81). Nach Stimulation mit VEGF und damit verbundener NO-Produktion bilden sich kapillarähnliche Strukturen. Dieser Prozess kann durch den Einfluss von NO-Synthase-Antagonisten aufgehalten werden (82), (83). Die Ausprägung der Angiogenese ist abhängig vom Grad der NO-Aktivität. Bei niedriger NO-Aktivität ist auch die Angiogenese weniger ausgeprägt (79). Stickstoffmonoxid ist nicht nur zellproliferationsfördernd sondern zusätzlich auch ein wichtiger Überlebensfaktor für das Endothel, denn es unterdrückt den programmierten Zelltod (Apoptose) (84). Der schon zuvor beschriebene vasodilatative Effekt scheint die Angiogenese ebenfalls zu unterstützen. Ein erhöhter Blutfluss geht dabei mit einer gesteigerten Endothelzellproliferation einher (74), (85). Der Einfluss der induzierbaren NO-Synthase und die damit verbundenen angiogenetischen Effekte des Stickstoffmonoxids tragen auch im Rahmen der altersabhängigen Makuladegeneration zur Entstehung des Krankheitsbildes bei (12), (15). Stickstoffmonoxid wird in der Retina und im subretinalen Raum ein pro-angiogener Effekt zugeschrieben. Bei transgenen Mäusen mit hoher VEGF-Expression in Photorezeptorzellen resultierte der Mangel an einer der drei Isoformen der NO-Synthasen in einer weniger ausgeprägten Neovaskularisation (86).

1.7.1.2 COX2

Die Zykllooxygenase 2 (COX2) katalysiert als Enzym die Synthese von Thromboxan und Prostaglandinen aus der Arachidonsäure. Arachidonsäure wird aus Zellmembranphospholipiden nach Aktivierung der Phospholipase A2 gebildet (87).

Das gebildete Thromboxan spielt eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung. Prostaglandine zeigen dagegen ein weiteres Wirkspektrum. Durch Prostaglandin wird die Salzsäureproduktion im Magen reduziert und die Bildung des schützenden Schleims gefördert. Prostaglandine wirken vasodilatativ, lösen Schmerzen und Fieber aus und erleichtern durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität die Immunantwort im entzündeten Gewebe. Zusätzlich können Prostaglandine Apoptose induzieren (74).

COX2 wird auf bestimmte Reize, wie bei Entzündungen oder Verletzungen, durch Ausschüttung der Zytokine TNF- α oder IL-1, exprimiert. Auch Pathogene, wie zum

Beispiel Lipopolysaccharide auf Oberflächen von Bakterien, können die Expression von COX2 induzieren (88). In vitro konnte festgestellt werden, dass COX2 und die induzierbare NO-Synthase ko-induziert werden. Unter diesen Bedingungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid sowohl die Expressionsrate, als auch die Aktivität der COX2 reduziert (89). Die COX2 kommt in mehreren Zellarten vor. In Makrophagen wird sie über die Aktivierung des CD-14 Rezeptors durch Lipopolysaccharide induziert. Die darauffolgende Prostaglandinsynthese führt zum Fieber. In RPE Zellen führt unter anderem die Phagozytose von Bestandteilen der Photorezeptoraussensegmente zur COX2 Expression (90). Außerdem findet man COX2 in Endothelzellen proliferierender Gefäße, in entzündetem Gewebe und in sogenannten Schaumzellen artherosklerotisch veränderter Gefäße. Hier führen Scherkräfte an der Gefäßwand zur Induktion des Enzyms. Des Weiteren steht die COX2 zurzeit im Fokus onkologischer Forschung. In Tumorzellen findet man oft eine erhöhte Expression des Enzyms. Die damit verbundene Prostaglandin-E2 Synthese fördert die Bildung des VEGF und regt so die Angiogenese an (88). In diesem Zusammenhang konnten Tsujii et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass COX2 die Angiogenese reguliert. Wenn COX2 überexprimiert wird, erfolgt durch die vermehrte Prostaglandinsynthese eine Stimulation der endothelialen Migration und Gefäßneubildung (91). Im Gegensatz dazu kann durch eine herabgesetzte COX2 Aktivität auch eine geringere VEGF-Produktion in RPE Zellen sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet werden (92).

Es ist bekannt, dass Tumorzellen, die vermehrt COX2 exprimieren, oft ein großes Volumen zeigen und das umgebende Gewebe reich an Blutgefäßen ist. Die Behandlung mit einem selektiven COX2 Hemmer konnte im Rattenmodell unter anderem zu einer Reduktion des VEGF und anderer Chemokine führen, die alle am Prozess der Gefäßneubildung beteiligt sind (93). Der angiogenetische Einfluss der Cyclooxygenase 2 wird auch in der Arbeit von Machado et al. deutlich. Hier zeigt ebenfalls ein COX2-Hemmer einen anti-angiogenetischen Effekt im Krankheitsbild der Endometriose (94). Bei der ischämisch bedingten proliferativen Retinopathie können selektive COX2 Inhibitoren den Prozess der vitrealen Neovaskularisation kontrollieren (95).

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Eine Reihe von Zellen und Zellinteraktionen sind im Rahmen der altersabhängigen Makuladegeneration bereits untersucht worden. Dabei hat sich herausgestellt, dass neben dem RPE auch Monozyten als wichtige Faktoren diskutiert werden (1), (12), (23), (24), (27), (31), (32), (33), (47), (59), (96). Ob ihnen dabei eine entzündungshemmende oder -fördernde Funktion zukommt, ist jedoch weitestgehend unklar. Die Beziehung zwischen retinalem Pigmentepithel und Monozyten, insbesondere die damit verbundene Zytokin- und Enzymexpression der Monozyten ist das zentrale Thema dieser Arbeit. Dabei sollte die Interaktion zwischen RPE und Monozyten untersucht werden. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang, ob und inwiefern zum Beispiel eine mögliche virale Aktivierung des RPE über TLR3-Rezeptoren immunologische Folgen haben kann, die den Prozess der altersabhängigen Makuladegeneration beeinflussen können.

In diesem Zusammenhang sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss aktiviertes retinales Pigmentepithel auf die Zytokin-Expression von Monozyten hat. Dabei wurde der humorale Einfluss von TLR3-aktivierten RPE-Zellen auf die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Enzyme von Monozyten untersucht. Außerdem wurde der Effekt auf die Expression von Interleukin-10, einem entzündungshemmenden Botenstoff untersucht. Die Ergebnisse können Hinweise darauf geben, welchen Einfluss Monozyten auf den Prozess der Entzündung und auch der Angiogenese bei der AMD haben.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank		Labotect, Göttingen
CXP Zytometer	CXP Cytomics 500 <i>Analysis Software</i>	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Durchflusszytometriergerät	Cytomics FC 500	Beckman Coulter Inc.,

		Brea, USA
Eismaschine	AF80	Scotsman, Milan, Italien
Messkammer	Take 3, <i>Multi-Volume Plate</i>	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Microzentrifuge		Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Mikroskop	Axiovert 1000	Carl Zeiss AG, Henningsdorf
PCR System	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Pipetten	<i>Research</i> ®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Realtime PCR System	7500 <i>Fast Real-Time</i> PCR System	Applied Biosystems, Technologies Corp., Carlsbad, USA
Sterilbank	BSK	Antair, New York, USA
Thermoblock	TDB 120 Thermostat	Biosan, Riga, Lettland
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	1086	GFL, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer, <i>Depth</i> 0,1mm 0,0025mm ²	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> - Servall ST40 - Centrifuge 5414 - Biofuge fresco 17 	Thermo Scientific, Dreieich Eppendorf AG, Hamburg Thermo Scientific, Dreieich

2.1.2 PC Software

<u>Programm</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
PCR Software	Abi 7500 <i>fast</i> v 2.0.6	Applied Biosystems, Technologies Corp., Carlsbad, USA
Photometer Programm	Gen5 <i>Take3</i>	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
FACS Programm	Cytomics FC 500 <i>Flow Cytometrie</i>	Beckman Coulter Inc., Brea, USA

2.1.3 Verbrauchsgegenstände

<u>Gegenstand</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Einmal-Spritzen 10 ml	<i>INJEKT</i>	Braun AG, Melsungen
Einweg Pipettenspitzen	25 ml <i>serological pipette</i>	Th. Geyer, Hamburg
FACS Röhrchen	5 ml <i>Tubes</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Filter	<i>Nalgene Syringe Filter</i> 0,2 µm	Thermo Scientific, Dreieich
Klebefolie	<i>MicroAmp Clear Adhesive Film</i>	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
Lanzetten	<i>Microlance 3 20G</i>	BD Bioscience, Heidelberg
PCR Platte	96 <i>well Multiply half skirt</i>	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Plattenhalter		Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Präzisionswischtücher	Kimberly- Clark	Kimtech Science, Roswell, Canada

Reagenzgefäße	<ul style="list-style-type: none"> - <i>High-Clarity Propylene Conical Tube</i>, 15 ml - <i>Polypropylene Conical Tube</i>, 50 ml - <i>Microtube</i> 0,5 ml, 1,5 ml - <i>Multiply- Pro</i> 0,2 ml, <i>PCR performance tested</i> 	BD Bioscience, Heidelberg BD Bioscience, Heidelberg Sarstedt, Nürnbrecht Sarstedt, Nürnbrecht
Saugpumpe	<i>Vacunsafe comfort</i>	Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Zellkulturflaschen	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Cellstar tissue Culture Flasks</i> - 25 cm² Wachstumsfläche 	Bio On GmbH, Fickerhausen TPP, Schwerin
Zellschaber	<i>Cell scraper</i> 16 cm	Sarstedt, Nürnbrecht

2.1.4 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Aqua bidest	Ampuva® Spüllösung 1000 ml Plastipur	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Biocoll Lösung	<i>Separating Solution</i>	Biochrom AG, Berlin
Chloroform		Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
DNAse Puffer	<i>10x Reaction Buffer</i>	Promega, Mannheim
EDTA Pulver	<i>Tetrasodium salt hydrate, practicalgrade, approx.</i>	Merck, Darmstadt

	95 %	
Ethanol 75 %		Büfa, Hude
Flowcheck	770 <i>Fluorospheres</i> <i>Polystyrene Fluorospheres</i> 10 ml at 1×10^6 /ml,	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Glycogen 70 mg/ml		Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
Isopropanol		Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
LPS	Lipopolysaccharid	Calbiochem, La Jolla, USA
Poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>	Calbiochem, La Jolla, USA
Pufferlösung	<i>5x Reaction Buffer</i>	Thermo Scientific, Dreieich
Stopplösung	<i>Stop Solution</i>	Promega, Mannheim
Trizol Lösung	TRIzol® Reagent	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA

2.1.5 Seren

<u>Serum</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Bovines Serum Albumin	<i>BSA, Albumin from Bovine Serum</i>	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fetal Calv Serum	FCS, Fetales Kälber Serum	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
Porcine Serum		Applied Biosystems,

		Life Technologies Corp., Carlsbad USA
--	--	--

2.1.6 Zellkulturmedien und -reagenzien, Rezepte

<u>Medium</u>	<u>Inhalt/Bemerkung</u>	<u>Hersteller</u>
1% Bovines Serum Albumin	20 ml PBS+ 20 %iges BSA	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
Monozytenmedium	500 ml RPMI, PAA + 50 ml FCS (<i>fetal calf serum</i>) + 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 µg/ml)	PAA, Pasching, Österreich Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA Biochrom, Berlin
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	10x	Biochrom, Berlin
RPE Medium	DMEM High Glucose 4,5 g/l+AA MEM, + <i>Non Essential Amino Acids</i> +Penicillin/Streptomycin, 10.000 µg/ml	PAA, Pasching, Österreich Biochrom, Berlin Biochrom, Berlin

2.1.7 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
DNAse	<i>RNAse Free-DNAse RQ1</i>	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase	<i>Revert Aid H Minus, M-Mul V Reverse</i>	Thermo Scientific, Dreieich
Taqman Polymerase	<i>Universal PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA

2.1.8 Immunstimulans

<u>Zytokin</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
GMCSF beta	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA

2.1.9 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Antikörper CD14	MY4-FITC CD14	Beckman Coulter Inc., Californien, USA
Isokörperkontrolle	Mslg G2b-FiTC	Beckman Coulter Inc., Californien, USA

2.1.10 Nukleotide

<u>Nukleotid</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
dNTP	<i>Desoxynucleotide Mix, 10 mM each dNTP</i>	5Prime GmbH, Hamburg

Primer	<i>Random Hexamer</i> 0,2 µg/µl	Thermo Scientific, Dreieich
--------	------------------------------------	-----------------------------

2.1.11 Gene Expression Assays

<u>Gen</u>	<u>Assay ID</u>	<u>Hersteller</u>
TNF-α	Ss03391318_g1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
IL-1β	Ss03393804_m1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
IL-6	Ss03384604_u1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
IL-10	Ss03382372_u1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
iNOS	Ss03374608_u1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
PGHS-2 (COX2)	Ss03394695_g1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA
18s	Hs99999901_s1	Applied Biosystems, Life Technologies Corp., Carlsbad USA

2.2 Methoden

2.2.1 Monozytenpräparation

Die Präparation der Monozyten aus dem Blut wurde nach Berg et al. vorgenommen (97). Um die Gerinnung des zu untersuchenden Blutes zu verhindern, wurde zunächst eine 0,01-prozentige EDTA-Lösung in PBS hergestellt. Am Morgen vor der Präparation wurde Blut eines frisch geschlachteten Schweines in eine Flasche mit der EDTA-Lösung gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es sich hierbei nur um das reine Blut eines Schweines handelt und es nicht zur Vermischung mit dem Blut weiterer Tiere kam. Die folgenden Schritte wurden unter möglichst keimfreien Bedingungen unter einer Zellkulturwerkbank durchgeführt. Vor dem weiteren Gebrauch des Blutes wurde die Flasche leicht geschwenkt, sodass sich eventuelle Sedimente lösten. Danach wurde in 5 Reagenzgefäße jeweils 25 ml Blut mit 25 ml zimmertemperaturwarmem PBS verdünnt. Mit dieser Menge an Blut konnte am Ende eine Monozytenzahl von im Mittel 17,12 Millionen Monozyten gewonnen werden, mit der sich etwa 8 verschiedene Ansätze kultivieren ließen. Je nach Versuchsansatz ließ sich durch die zu Beginn eingesetzte Blutmenge die endgültige Monozytenanzahl variieren. Parallel zu den 5 Falcons, die das verdünnte Blut enthielten, wurden 8 weitere 50 ml Reagenzgefäße mit 20 ml Biocoll-Lösung befüllt. Jedes dieser Reagenzgefäße wurde jetzt mit ca. 30 ml der Blutlösung überschichtet (siehe Abbildung 2). Darauf folgte eine Zentrifugation mit 2000 U/min für 20 Minuten. Hierbei sollte die Zentrifuge ohne Bremse auslaufen, da es beim Bremsvorgang zur erneuten Vermischung der zuvor getrennten Phasen kommen kann. In dieser Zeit wurden 4 große Zellkulturflaschen mit jeweils 15 ml Porcine Serum befüllt und für eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Das Porcine Serum diente als Nährboden für die später ausgesetzten Monozyten. Nach einer Stunde wurden die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank genommen. Das Porcine Serum wurde abgesaugt und die Flaschen einmal mit zimmertemperaturwarmem PBS gespült und erneut abgesaugt. Nach Beendigung der Zentrifugation der mit Blut gefüllten Reagenzgefäße, ließen sich in den Gefäßen jeweils drei Phasen erkennen. Am Boden der Gefäße sammelten sich die Erythrozyten. In der Mitte des Reagenzgefäßes erkannte man einen weißen Interphasering. Hier sammelten sich die Monozyten. Oberhalb der Interphase sammelte sich Blutplasma. Unterhalb des

Interphasering befand sich die Biocolllösung (siehe Abbildung 3). Durch leichtes Schwenken konnte man nun den an der Innenseite des Reagenzgefäßes klebenden Teil des Interphasering vorsichtig lösen. Mit einer Eppendorf Pipette ließ sich der Interphasering abpipettieren und in einem neuen Reagenzgefäß auffangen. In diesem neuen Gefäß wurden 15 ml des Monozytenmediums vorgehalten. Nach dem Abpipettieren der Interphaseringe in neue Reagenzgefäße, wurden diese Gefäße mit dem gewonnenen Zellmaterial mit Monozytenmedium bis zur 50 ml Marke aufgefüllt. Darauf folgten drei Zentrifugationsschritte (200 g für 10 min./5 min./5 min.). Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde der Überstand jeweils abgesaugt, das Sediment resuspendiert und das Reagenzgefäß mit kaltem PBS wieder aufgefüllt. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde das Sediment erneut resuspendiert und auf 30 ml mit Zimmertemperatur warmem Monozytenmedium aufgefüllt. In diese 30 ml Monozytenlösung wurde zusätzlich 0,1 prozentiges Bovines Serum Albumin gegeben.



Abbildung 2: Überschichtung der Biocolllösung mit 30 ml Blutlösung. In der nachfolgenden Dichtezentrifugation wurden die Blutzellen voneinander getrennt.

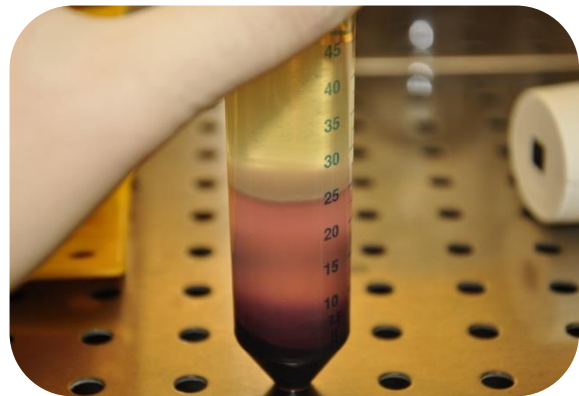


Abbildung 3: Reagenzgefäß nach Zentrifugation. Auf Höhe der 25ml Markierung erkennt man den Interphasering, der die Monozyten enthält.

In jede der 4 großen mit Procine Serum inkubierten Zellkulturflaschen wurden nun 15 ml der Monozytenlösung gegeben und die Flaschen erneut für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand in den Zellkulturflaschen vorsichtig abgesaugt. Die Flaschen wurden drei- bis viermal mit warmem Monozytenmedium

gespült. Dabei wurden die Flaschen vorsichtig beklopft, sodass sich Zellen, die noch nicht am Boden der Kulturflaschen fixiert waren, lösten. Die nicht fixierten Zellen, z.B. T-Zellen oder anderen Leukozyten konnten so von der Monozytenpopulation getrennt werden. Zuletzt wurden in jeder Kulturflasche 15 ml des Monozytenmediums belassen und unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen am Boden der Flasche festsetzten und sich beim vorsichtigen Schwenken keine Zellen mehr lösten. Die Zellkulturflaschen wurden nun bis zum nächsten Morgen im Brutschrank gelagert. Nach ca. 20 Stunden wurden die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank genommen und für eine Stunde auf Eis gelagert. Um die kultivierten Zellen zu lösen, wurden die Flaschen nun mehrere Male kräftig auf eine Arbeitsfläche geklopft und der Boden der Zellkulturflaschen mit einer Pipettierhilfe mehrere Male gespült. Als Spüllösung diente das bereits in den Flaschen befindliche Monozytenmedium. Nach mehreren Spülschritten wurde die Monozytenlösung langsam aus den Zellkulturflaschen aspiriert und in 15 ml Gefäßen gesammelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 200 g für 8 Minuten. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und die Sedimente resuspendiert. Die Suspensionen wurden in einem 15 ml Reagenzgefäß gesammelt. In diesem Gefäß befanden sich nun alle gewonnenen Monozyten. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.2.2 Aufteilung der Monozyten auf Zellkulturflaschen

Die Monozyten wurden auf kleine Zellkulturflaschen verteilt (siehe Abbildung 4). Die Zellzahl sollte pro Kulturflasche eine Millionen Zellen pro Flasche nicht unterschreiten. Ein Milliliter der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Monozytenreinheit mittels Durchflußzytometrie zurückbehalten (siehe Kapitel 2.2.3). Die Kulturflaschen wurden bis auf 5 ml mit Monozytenmedium aufgefüllt und für 24 Stunden inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit folgte die Behandlung mit den Überständen der TLR-3-aktivierten retinalen Pigmentepithelzellen (siehe Kapitel 2.2.5). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 Tagen wurden die Monozyten mittels Trizollösung lysiert, um die RNA zu extrahieren (siehe Kapitel 2.2.6).

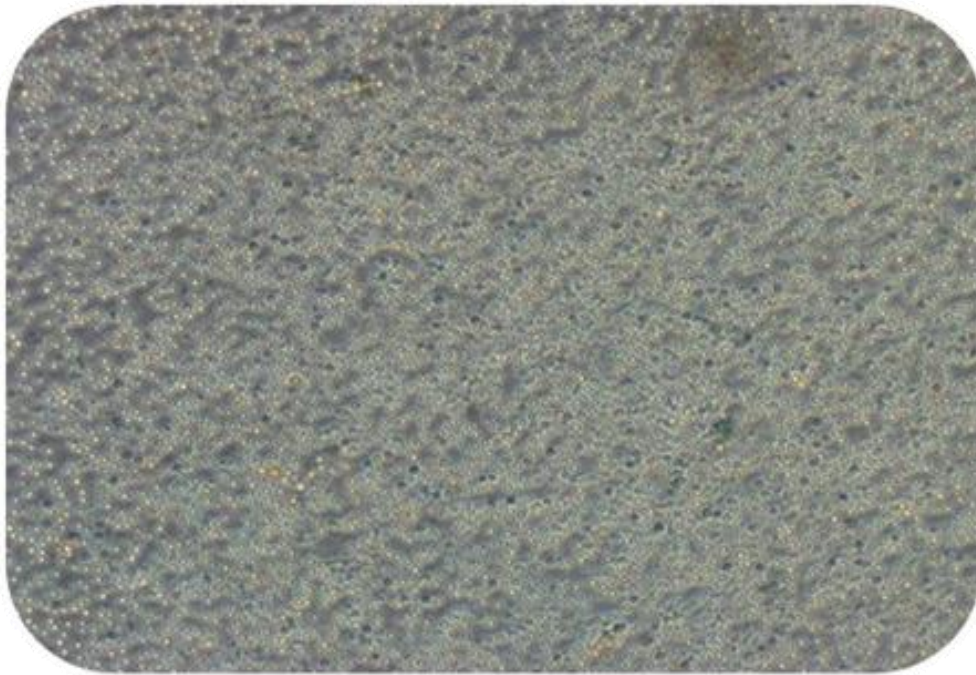


Abbildung 4: Intakte Monozyten auf dem Boden einer Zellkulturflasche unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 1000, Carl Zeiss AG, zweihundertfache Vergrößerung) am 1.Tag nach der Präparation aus dem Blut.

2.2.3 Bestimmung der Monozytenreinheit

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (98), (99) können Partikel oder Zellen nach Größe, Struktur, Oberflächenbeschaffenheit oder intrazellulären Bestandteilen unterschieden und sortiert werden. Voraussetzung ist oftmals die vorrangegangene Markierung der Zellen oder des untersuchten mikroskopisch kleinen Partikels mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper. Die markierten Zellen werden im Durchflusszytometriegerät von einem Laserstrahl getroffen, sodass es zur Lichtstreuung kommt. Strahlen, die nach vorne abgelenkt werden, liefern Daten über die Größe der Partikel oder Zellen. Dies wird als Vorwärtstreulicht (*Forwardscatter*, FSC) bezeichnet. Licht, das im 90 Grad Winkel abgelenkt wird, heißt Seitwärtstreulicht (*Sidescatter*, SSC) und dient als Maß für die Granularität des untersuchten Materials. Durch den Einsatz Fluoreszenz-markierter Antikörper ist es möglich, verschiedene Zelltypen zu identifizieren. Dazu binden die markierten Antikörper an spezifische Zelloberflächenmoleküle. Die Farbstoffe werden durch das monochromatische Licht des Lasers angeregt und senden je nach eingesetztem

Fluorochrom, Licht in einer bestimmten Wellenlänge aus. Ein System aus Spiegeln und Filtern trennt die ausgehenden Strahlen in die verschiedenen Wellenlängenbereiche auf und Detektoren registrieren in entsprechenden Fluoreszenzkanälen die eintreffende Strahlung. Bei dem in diesem Projekt eingesetzten Fluorochrom handelte es sich um einen FITC-markierten CD-14 Antikörper. Dieser ließ sich durch einen Argon-Ionenlaser anregen, sodass ein Fluoreszenzemissionsmaximum von 519 nm erreicht wurde. Bei dem CD-14-Molekül handelt es sich um den Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein (57) und kennzeichnet die Oberfläche von Monozyten.

Für die Bestimmung der Monozytenreinheit wurden $2-3 \times 10^5$ Zellen in ein Reagenzgefäß gegeben und kurz zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl 1 % bovinem Serum Albumin gelöst. Im Anschluss wurden 10 µl des CD-14 Antikörpers hinzugegeben und das Reagenzgefäß für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert. Dieser Arbeitsschritt wurde ebenfalls für die Isotypkontrolle durchgeführt.

Nach Ablauf der 30 Minuten wurde in jedes Reagenzgefäß 1 ml des 1 % BSA zugegeben. Es folgte eine kurze Zentrifugation und erneute Absaugung des Überstandes. Das Sediment wurde in 400 µl der 1 % BSA-Lösung resuspendiert und die so gewonnene Zelllösung in ein entsprechendes Röhrchen pipettiert.

Bei Befüllen des Röhrchens wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen, die das Messergebnis verfälschen konnten, im Gefäß befanden. Die Messung der Monozytenreinheit erfolgte mit Cytomics FC 500 *Flow Cytometrie*.

2.2.4 Präparation von RPE-Zellen

Zur Gewinnung der benötigten retinalen Pigmentepithelzellen modifiziert nach Wiencke et al. (100) wurden die Augen von frisch geschlachteten Schweinen verwendet. Diesen wurde nach der Enukleation überschüssiges Gewebe und Muskulatur entfernt. Darauf folgte die Inkubation in Betaisodona-Lösung (Betaisodona 1:3 in NaCl) für mindestens 3 Minuten. Anschließend wurden die Augen in sterile Natriumchloridlösung überführt. Es folgte die Exzision des vorderen Augenanteils inklusive Linse und Glaskörper. Mit Hilfe von warmer

Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde aus dem hinteren Augenabschnitt die Retina abpräpariert und verworfen. Der übrig gebliebene Augenbecher wurde für 5 Minuten bei 37°C mit Trypsin behandelt.

Nach dieser ersten Trypsinbehandlung folgte in einem zweiten Schritt die Inkubation für 45 Minuten bei 37°C in Trypsin-EDTA. Anschließend konnten die RPE Zellen von der Bruch'schen Membran gespült werden. In speziellem Zellkulturmedium wurde das gewonnene Material nun zweimal für 5 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Das zentrifugierte Zellmaterial wurde daraufhin in neuem Zellkulturmedium resuspendiert und bei 37°C in 60 mm Zellkulturschalen unter einer Einwirkung von 5% CO₂ kultiviert. Das zur Kultivierung verwendete Zellkulturmedium setzte sich zusammen aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat (HEPES), 1% Penicillin/Streptomycin, Natrium Pyruvat und 10% fötalem Kälberserum (fetal calf serum (FCS)). Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit neuem Zellkulturmedium versorgt. Die im weiteren Verlauf des Projekts aktivierten RPE-Zellen entsprachen alle der F2 Generation (siehe Abbildung 5).

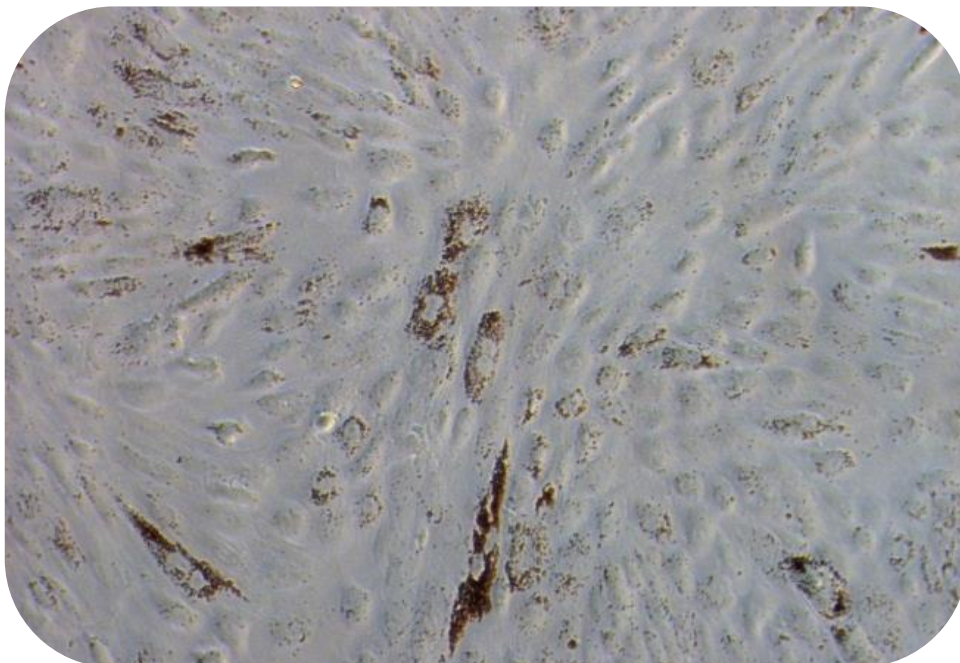


Abbildung 5: Intakte RPE Zellen der F2 Generation unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 1000, Carl Zeiss AG, zehnfache Vergrößerung)

Diese Generation zeigte den charakteristischen Zellverbund und war zum Teil immer noch pigmentiert. Zur Vermehrung der Zellen wurden diese zuerst mit warmer PBS-Lösung gespült und anschließend wieder für 5 Minuten bei 37°C in Trypsin-EDTA inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden nun die Zellen vom Boden der Kulturschalen gelöst und in neues Medium aufgenommen. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 900 U/min. Die Zellen wurden daraufhin mit 3 ml Medium in neue Zellkulturflaschen ausgesetzt.

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde die Intaktheit und Morphologie jeder einzelnen Generation überprüft. (100), (101), (102)

2.2.5 Aktivierung der RPE-Zellen und Zugabe der Überstände auf Monozyten

Die verwendeten RPE-Zellen der F2 Generation wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg, 10 µg) des TLR3-Agonisten „*Polyinosinic-polycytidylic acid*“ (Poly I: C) behandelt. Dieses Poly I:C stimuliert den TLR-3-Rezeptor, da es strukturähnlich zu doppelsträngiger RNA ist (43).

Zur Aktivierung der präparierten RPE-Zellen wurde der Überstand in den Zellkulturschalen abgesaugt und in die Schalen erneut frisches Medium gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Poly I:C Konzentrationen (1 µg/ml und 10 µg/ml) Eine RPE-Zellreihe wurde als Negativ-Kontrollarm unbehandelt gelassen. Daraufhin wurden die Zellkulturschalen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände einzeln abgesaugt und nach steriler Filtration in 15 ml Reaktionsröhrchen gegeben. Die zuvor präparierten und noch unbehandelten Monozyten wurden nun ebenfalls nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit aus dem Brutschrank genommen. Der Überstand in den Zellkulturflaschen wurde abgesaugt und die filtrierten Überstände der RPE-Zellen nach folgendem Schema (siehe Tabelle 1) zugegeben:

<u>Ansätze</u>	<u>RPE Überstand</u>	<u>Poly I:C</u>	<u>Nur Poly I:C</u>
<i>Ansatz 1</i>	-	-	-
<i>Ansatz 2</i>	+	-	-
<i>Ansatz 3</i>	-	-	1 µg
<i>Ansatz 4</i>	+	1 µg	-
<i>Ansatz 5</i>	-	-	10 µg
<i>Ansatz 6</i>	+	10 µg	-

Tabelle 1: Versuchsanordnung mit jeweils 1 Mio. Monozyten pro Ansatz

Ansatz 1 war die Negativ-Kontrolle. Die Monozyten wurden unbehandelt belassen. In *Ansatz 2* wurde den Monozyten der reine RPE-Überstand zugegeben. Das Pigmentepithel wurde hier zuvor nicht mit einer Poly I:C Konzentration behandelt. Die Ansätze 3 und 5 sollten zeigen, ob Monozyten eventuell ohne die Anwesenheit von retinalen Pigmentepithelzellen eine Reaktion nur auf die Behandlung mit dem TLR3-Agonisten Poly I:C zeigten. Die Monozyten in *Ansatz 4* und *6* wurden jeweils einem RPE-Überstand ausgesetzt, der zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg, 10 µg) des TLR3-Agonisten behandelt wurde. Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurden die Monozyten mittels TRIzol® lysiert und die RNA extrahiert.

2.2.6 Trizolablösung nach Chomczynski et Sacchi

Für die Bestimmung der Zytokinexpression wurde die RNA der Monozyten benötigt. Um an die RNA zu gelangen, wurde das Verfahren nach Chomczynski et Sacchi (103) verwendet. Die Monozyten wurden mit TRIzol® der Firma Invitrogen behandelt, welches ein Reagenz aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat ist. Es zerstört die behandelten Zellen und inaktiviert RNAsen, sodass sich im Phenolanteil die DNA und Proteine lösen.

Aus den Zellkulturflaschen wurde der Überstand abgesaugt. Jede Flasche wurde mit etwa 2 ml kaltem, sterilen PBS zweimal gespült. Das PBS wurde anschließend aus den Zellkulturschalen wieder entnommen und 1 ml TRIzol® zugegeben. Die Flaschen wurden verschlossen und vorsichtig geschwenkt, sodass sich der gesamte Flaschenboden mit TRIzol® bedeckte. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Mit einer Pipette wurde die TRIzol®-Lösung aus den Flaschen entfernt und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß gegeben. Bis zur

weiteren Verarbeitung konnte die Lösung bei -70 Grad Celsius eingefroren werden. (104)

2.2.7 RNA Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurden in einem ersten Schritt die mit PBS gewaschenen Monozyten, wie bereits beschrieben, durch Zugabe von 1 ml TRIzol®-Reagenz je Ansatz lysiert. Zu den Lysaten wurden dann pro 1 ml TRIzol®-Reagenz 200 µl Chloroform pipettiert, der Ansatz von Hand für ca. 15 Sekunden aufgeschüttelt und dann für ca. 2-3 Minuten bei 15 - 30 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde jeder Ansatz für 15 Minuten bei 12000 g und einer Temperatur von 2-8 °C zentrifugiert. In diesem Schritt teilte sich jede Probe in drei Phasen auf: Eine untere rote Phenolphase, die DNA und Protein enthielt, eine mittlere Interphase und eine obere wässrige Phase mit RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1 µl Glycogen (70 mg / ml) vermischt. Im nächsten Schritt wurden jeder Probe 500 µl Isopropylalkohol zugesetzt, erneut vermischt und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 15-30 °C die Proben für 10 Minuten bei 12000 g und 2-8 °C zentrifugiert. Die RNA konnte danach als gelartiges Sediment am Boden der Reaktionsgefäße ausgemacht werden. Der Überstand jeder Probe wurde entfernt und die RNA-Sediment in jeweils 1 ml Ethanol (75 %) pro ml Trizol-Reagenz gewaschen und für 5 Minuten bei 7500 g und 2-8 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die RNA-Sedimente unter der Sterilwerkbank luftgetrocknet. In einem letzten Schritt wurden die RNA-Sedimente je nach Menge in 20 - 50 µl RNase-freiem zweifach destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 55-60 °C durch eine zehnminütige Inkubation im Heizblock gelöst und die isolierte RNA quantifiziert (104), (105).

2.2.8 Quantifizierung der extrahierten RNA

Zur Bestimmung des RNA-Anteils jeder Probe wurde jeweils 2 µl einer Probe in die Messkammern des Photometers gegeben und die Extinktion gegen einen Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch in einem Spektrophotometer bestimmt. Gleichzeitig wurde der Proteingehalt der Probe bei 280 nm ermittelt. Der

Quotient aus den beiden Messungen zeigte die Reinheit der Probe, wobei der angestrebte Reinheitsgrad bei 1,7 - 2,0 lag. Im Anschluss daran erfolgte die Umschreibung in cDNA (104), (106).

2.2.9 cDNA- Synthese

Das Prinzip bei der Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) beruht darauf, dass sich unspezifische Primer mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren. An diesen Komplex aus Primer und RNA lagert sich eine reverse Transkriptase an und synthetisiert unspezifisch mit der RNA als Vorlage cDNA. Zur Synthese von cDNA wurden je 1 µg der extrahierten mRNA auf ein Gesamtvolumen von 7 µl mit RNase freiem zweifach destilliertem Wasser aufgefüllt und mögliche genomische DNA Reste in den Proben durch Zugabe von 1 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase (10000 units) und einer anschließenden Inkubation im Thermocycler für 15 Minuten bei 37 °C verdaut. Um die Aktivität der DNase zu unterbrechen, wurden 1 µl Stopplösung (EDTA 25 mM) zu jedem Ansatz pipettiert und bei 65 °C für 10 Minuten im Thermocycler inkubiert. Dann wurden jeweils 1 µl eines Random Hexamer Primer-Gemisches (200 ng) zu den Ansätzen pipettiert und alles für 5 Minuten bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Im letzten Schritt wurden zu jedem Ansatz 8 µl eines Transkriptionsmixes, bestehend aus 4 µl 5×Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 nM) und 1 µl zweifach destilliertes Wasser pipettiert und die Probe für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert, bevor jeweils 1 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben wurde.

Die Probenansätze mit einem Gesamtvolumen von nun 20 µl durchliefen anschließend folgendes Programm im Thermocycler: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Währenddessen wurde die cDNA synthetisiert und am Ende das Enzym hitzeinaktiviert. Von dieser cDNA wurden nachfolgend bestimmte Abschnitte, die den Genabschnitten der oben genannten Zytokine entsprachen, mittels Realtime-PCR amplifiziert. (104), (107)

2.2.10 Realtime PCR

Die Realtime - PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion. Die einfache Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur enzymatischen

Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Aus einem Gemisch von DNA-Material lässt sich mit Hilfe der PCR ein einzelnes Molekül amplifizieren. Während der Reaktion lagern sich spezifische Oligonukleotidprimer an die Zielregion auf der DNA an und werden durch Anlagerung von weiteren Nukleotiden verlängert. Diese Primer legen den Startpunkt für die DNA-Neu-Synthese fest. Zum Reaktionsgemisch werden außerdem noch eine DNA-Polymerase und eine Mischung der vier Desoxynucleotid-Triphosphate (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) benötigt. Die PCR durchläuft dazu mehrere Reaktionsschritte. Zunächst wird das Gemisch auf 94 Grad Celsius erhitzt, sodass sich die DNA-Stränge voneinander trennen (Denaturierungsphase). Es bilden sich Einzelstränge, ein *Sense*-Strang und ein *Antisense*-Strang. Im folgenden Schritt bei einer Temperatur zwischen 55° und 65° Celsius lagern sich die Primer an die einzelnen Stränge an (Primer-*Annealing*). Das Temperaturoptimum ist abhängig von der Länge und der Sequenz der eingesetzten Primer. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72 Grad Celsius erhöht und die DNA-Polymerase beginnt mit der Anlagerung neuer Nukleotide am 3'-Ende der DNA-Sequenz (Elongation). Dieser Reaktionsablauf wiederholt sich mehrere Male. Nach dem ersten Zyklus sind aus einem DNA-Ausgangsstrang zwei DNA Doppelstränge entstanden. In den folgenden Zyklen vermehren sich diese DNA- Abschnitte exponentiell, da die Primer immer mehr Material zur Verfügung haben, an dem sie sich anlagern können. Zusätzlich zur reinen Amplifikation ist bei der Realtime-PCR eine Quantifizierung der amplifizierten DNA zu jedem Zeitpunkt möglich. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenzmessung durchgeführt. (108), (109)

2.2.11 DNA- Quantifizierung

Für die Mengenbestimmung der DNA wird eine Exonuklease-Fluoreszenzsonde verwendet, die aus einem Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein (FAM)) und einem *Quencher*-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA)) besteht. Dabei hemmt der *Quencher*-Farbstoff einer intakten Sonde die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes. Die Sonde fungiert nicht als spezifischer Primer, lagert sich aber trotzdem an spezifischen cDNA-Molekülen an. Nach der Hybridisierung der Primer mit der cDNA und Beginn der Polymerisation durch die DNA-*TaqMan* Polymerase, verdrängt diese durch ihre 5'-3'- Exonukleaseaktivität die Fluoreszenzsonde von der

cDNA. Dabei löst sich der *Quencher*-Farbstoff vom Reporterfarbstoff. Die dabei entstehende Fluoreszenz nimmt proportional zur DNA-Menge zu und wird in der exponentiellen Vermehrungsphase (siehe Abbildung 6A) bestimmt, da nur hier optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Es wird dabei der Zyklus ermittelt in dem ein definierter Anstieg der Fluoreszenz vorliegt (C1-Wert). (110)

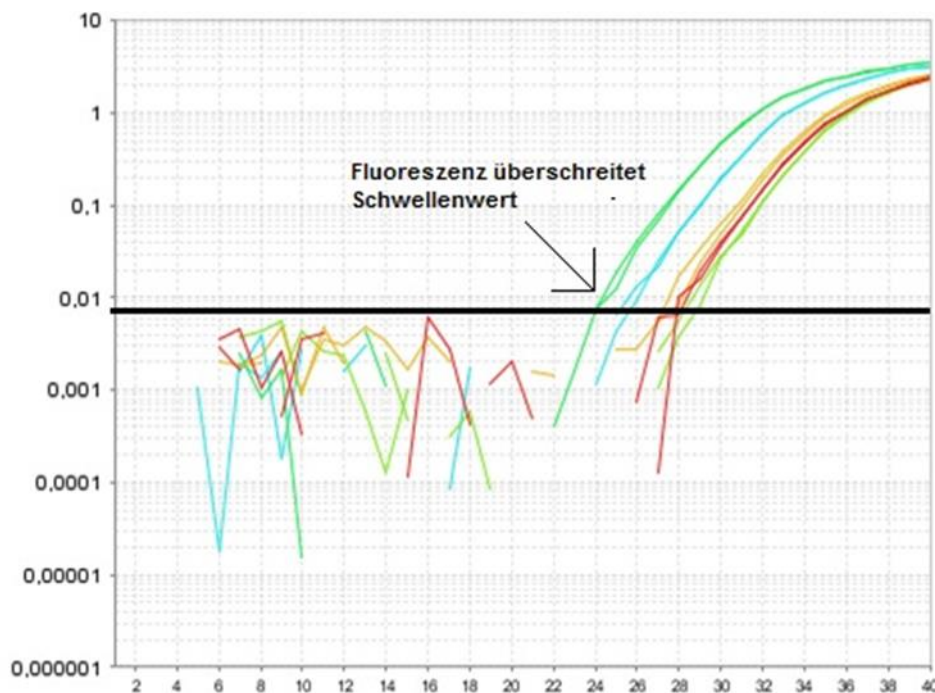


Abbildung 6A: Realtime PCR, x-Achse: Anzahl der Zyklen, y-Achse: DNA-Menge. Der Pfeil markiert die Überschreitung des Schwellenwertes. Ab hier beginnt die exponentielle Vermehrung der DNA. (Beispielabbildung aus eigenem Versuch: TNF- α Realtime PCR)

Es wurden spezifische Oligoprimer verwendet, um die spezifischen cDNA Moleküle exponentiell zu vermehren. Zum Nachweis der bereits vorgestellten inflammatorischen Mediatoren wurden vorgefertigte Primer gekauft. In diesen *Taq Man Assay on Demand* Lösungen sind der Sense- und der Antisenseprimer und Fluoreszenzsonden bereits enthalten. Es wurden TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, COX-2 und iNOS untersucht. Als endogene Kontrolle diente 18s RNA, ein *Housekeeping*-Gen. *Housekeeping*-Gene werden konstitutiv exprimiert. Sie werden durch äußere Einflüsse nicht reguliert und sind daher gut als Referenz-Gene geeignet.

Untersucht wurde die Expression der oben genannten Zytokine und Enzyme in Monozyten, nachdem diese nach dem beschriebenen Protokoll behandelt wurden.

Ein in der Realtime-PCR gemessener Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10 µl *Taq-Man*-Puffer, 1 µl des Primers für das entsprechende Zytokin, 5 µl zweifach destilliertem Wasser und 4 µl cDNA des entsprechenden Versuchsansatzes (2,5 ng/ml). Es wurden immer Doppelansätze eines Zielgens quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit dem ABI7500 Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems (siehe Abbildung 6B) mit folgendem Programm:

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Dauer [min]</u>	<u>Temperatur [°C]</u>
Vorinkubation	2	50
Aktivierung der Polymerase	10	95
Denaturierung	0,25	95
Annealing/Extension	1	60

Tabelle 2: Ablaufprogramm eines Durchgangs zur DNA-Quantifizierung

Dieser Ablauf wurde vierzigmal wiederholt.

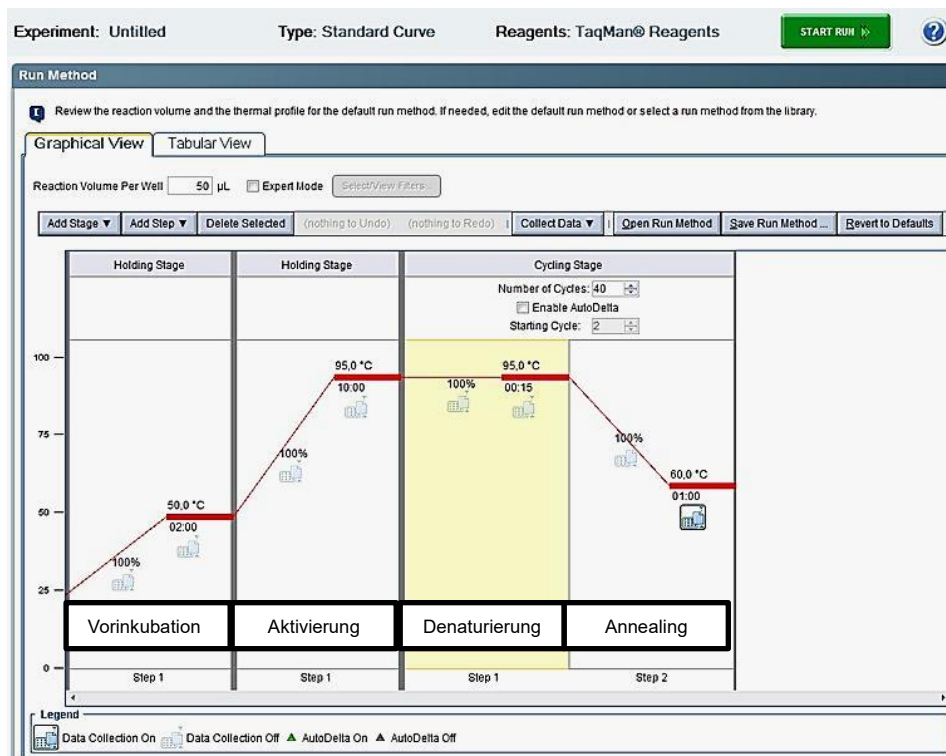


Abbildung 6B: ABI7500 PCR-Ablauf Schema. Das Reaktionsvolumen entsprach immer 20 µL. Dargestellt sind die 4 Schritte der DNA Amplifikation (siehe Tabelle 2).

Die Auswertung der Realtime-Reaktion erfolgte mit dem Computerprogramm Abi 7500 *fast* v 2.0.6 der Firma Applied Biosystems (104). Als Primer wurden TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, iNOS, COX2 und 18s genutzt. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe, d.h. Werte für die Zytokinexpression der unstimulierten Monozyten (siehe Tabelle 1: Versuchsanordnung, „Ansatz 1“) wurden gleich Eins gesetzt und dienten so als Referenzwert.

2.2.12 Statistische Auswertung der gemessenen Daten

Alle Experimente wurden drei bis siebenmal wiederholt. Zur Etablierung des Verfahrens der Monozytenisolierung wurden diese Versuche deutlich häufiger wiederholt. Die in den Experimenten aktivierten Monozyten, deren Zytokin- und Enzymexpression gemessen wurde, entsprachen alle einer ähnlichen Reinheit und Populationsgröße. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben. Ein p-Wert von 0,05 oder weniger wurde für das

Signifikanzniveau festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit STATISTICA 7.1 und Microsoft Excel Programmen. In den dargestellten Graphen sind Mittelwerte und Standardabweichungen angezeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Messung der Monozytenreinheit mittels Durchflußzytometrie

Die Monozytenreinheit gemessen an der CD14-Rezeptor Expression ergab einen Mittelwert von 93,49% \pm 2,39 %. Die Abbildung 8 zeigt eine Beispielmessung.

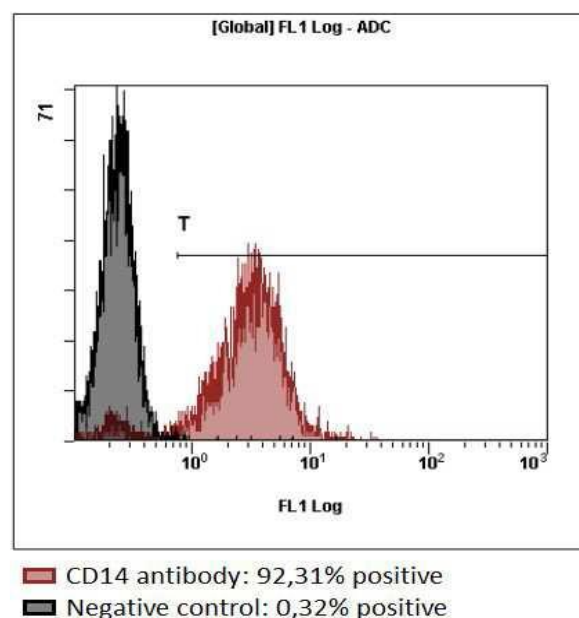


Abbildung 8: CD14 Expression: Die Expression des Oberflächenmoleküls CD14 auf Monozyten aus dem Blut frisch geschlachteter Schweine. Als Negativ-Kontrolle diente eine IgG2b – Isotyp Kontrolle. (96)

3.2 Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR

3.2.1 TNF- α

Die Behandlung mit dem Überstand von aktivierten RPE-Zellen zeigte keinen signifikanten Effekt auf die TNF- α Expression von Monozyten (siehe Abbildung 9). Folgende Werte wurden gemessen: Kontrolle **1.33 \pm 2.42**, 1 μ g/ml Poly I:C **0.6 \pm 0.48**, RPE + 1 μ g/ml Poly I:C **0.67 \pm 1.06**, 10 μ g/ml Poly I:C **0.92 \pm 0.58**, RPE + 10 μ g/ml Poly I:C **0.77 \pm 1.0**.

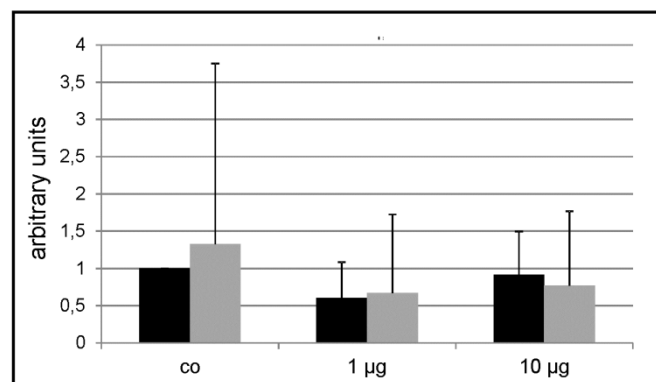


Abbildung 9: Änderung der TNF- α Expression in Monozyten nach Behandlung mit dem Überstand von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel für 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben. (96)

3.2.2 Interleukin-1 β

Für IL-1 β konnte keine Änderung der Expression festgestellt werden, wenn die Monozyten mit unbehandeltem RPE-Überstand in Kontakt kamen. Auffällig war jedoch die signifikante Reduktion der Expression, wenn die RPE-Zellen zuvor mit einer Poly I:C Konzentration von 1 μ g/ml behandelt wurden. Dieser Effekt konnte bei 10 μ g/ml allerdings nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Folgende Werte wurden gemessen: Kontrolle **0.78 \pm 0.55**, 1 μ g/ml Poly I:C **1.33 \pm 0.20**, RPE + 1 μ g/ml Poly I:C **0.31 \pm 0.25** ($p < 0.01$), 10 μ g/ml Poly I:C **2.68 \pm 1.22**, RPE + 10 μ g/ml Poly I:C **2.53 \pm 1.42**.

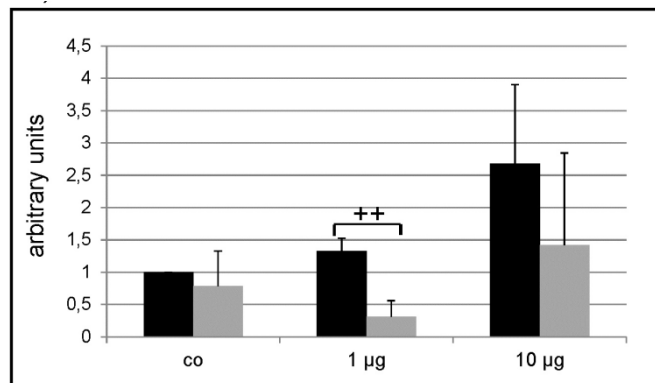


Abbildung 10: Änderung der IL-1 β Expression in Monozyten nach Behandlung mit dem Überstand von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel für 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben, (++) $p < 0,01$) (96).

3.2.3 Interleukin-6

Die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 wurde durch die Behandlung mit und ohne RPE-Überstand nicht signifikant beeinflusst. Die Grafik zeigt zwar einen deutlichen Anstieg der Expression mit zunehmender TLR-3- Aktivierung, durch die hohen Standardabweichungen konnte jedoch kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden (siehe Abbildung 11). Kontrolle 0.73 ± 0.78 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 0.86 ± 0.32 , RPE + 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 3.40 ± 4.56 , 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 4.92 ± 8.41 , RPE + 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 5.44 ± 6.99 .

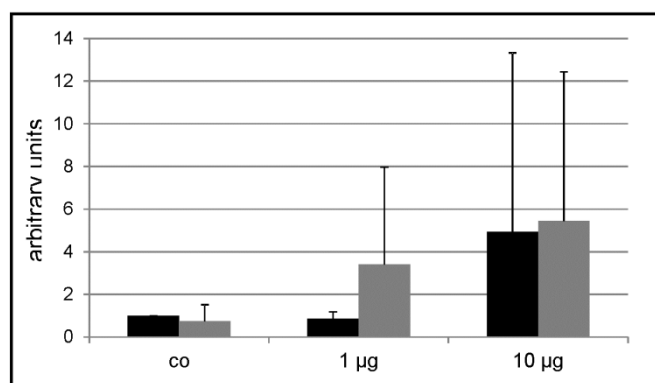


Abbildung 11: Änderung der IL-6 Expression in Monozyten nach Behandlung mit dem Überstand von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel für 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben (96).

3.2.4 Interleukin-10

Die TLR-3-Aktivierung des RPE durch die Behandlung mit Poly I:C konnte auch für die Expression von IL-10 in den Monozyten keine Effekte zeigen (siehe Abbildung 12). Kontrolle 1.11 ± 0.71 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 0.72 ± 0.53 , RPE + 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 1.99 ± 1.56 , 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 4.36 ± 5.77 , RPE + 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 2.53 ± 1.86 .

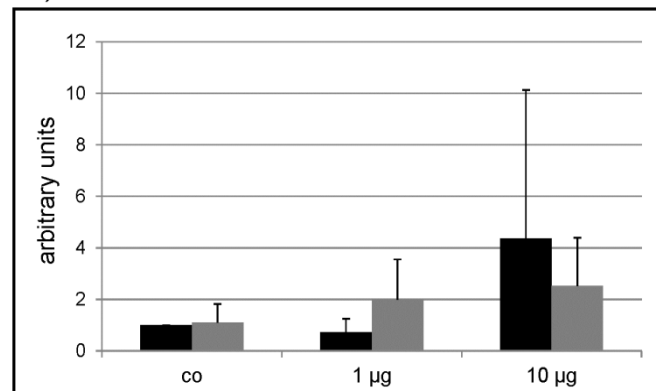


Abbildung 12: Änderung der Interleukin-10 Expression in Monozyten nach Behandlung mit dem Überstand von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel für 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben (96).

3.2.5 iNOS

Die Expression der induzierbaren NO-Synthase wurde durch die Zugabe von RPE-Überständen signifikant reduziert. Bereits unbehandeltes RPE führte zu einer bemerkenswert starken Reduktion der iNOS-Expression.

Mit Erhöhung der Poly I:C Konzentrationen nahm die Expression des Enzyms zunehmend ab (siehe Abbildung 13). Kontrolle: 0.57 ± 0.34 , $p < 0.05$; 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 0.76 ± 0.61 , RPE + 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 0.33 ± 0.51 , 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 1.11 ± 0.69 , RPE + 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C 0.06 ± 0.01 , $p < 0.05$.

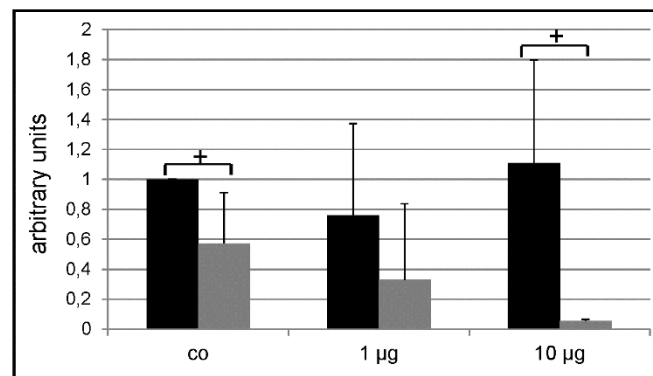


Abbildung 13: Änderung der iNOS Expression in Monozyten nach Behandlung mit dem Überstand von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel für 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben, (+ $p < 0,05$) (96).

3.2.6 COX2

Die Menge der Cyclooxygenase 2 konnte durch die Zugabe von unbehandeltem RPE-Überstand signifikant reduziert werden. Hier erreichte jedoch nur unstimuliertes RPE eine signifikante Reduktion. Die vorrangegangene Behandlung der RPE Zellen mit Poly I:C hatte keinen Einfluss auf die spätere COX2 Expression der Monozyten (siehe Abbildung 14). Kontrolle 0.21 ± 0.21 , $p < 0.001$; 1 µg/ml Poly I:C 1.1 ± 0.81 , RPE + 1 µg/ml Poly I:C 0.55 ± 0.71 , 10 µg/ml Poly I:C 1.08 ± 0.64 , RPE + 10 µg/ml Poly I:C 1.13 ± 1.74 .

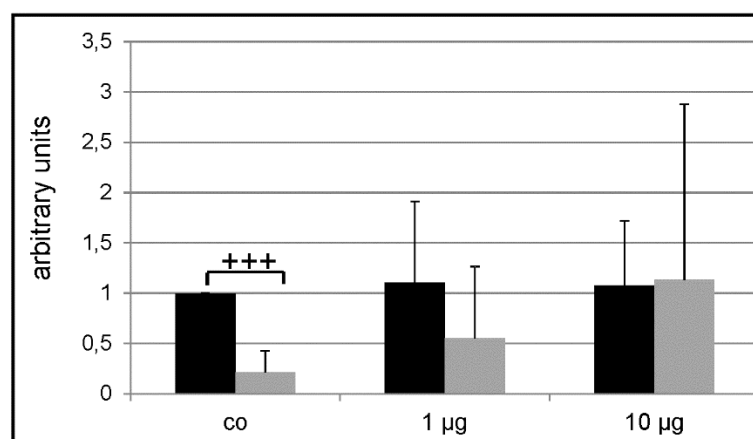


Abbildung 14: Änderung der COX2 Expression in Monozyten nach Behandlung mit dem Überstand von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel für 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben erhoben, (+++ $p < 0,001$) (96).

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

	<u>Poly I:C</u>	<u>RPE</u>	<u>RPE + Poly I:C</u>
TNF-α	kein Effekt	kein Effekt	kein Unterschied
IL-1β	kein Effekt	kein Effekt	reduziert
IL-6	kein Effekt	kein Effekt	kein Unterschied
IL-10	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
COX2	kein Effekt	reduziert	keine Reduktion
iNOS	kein Effekt	reduziert	stark reduziert

Tabelle 3: Effekte von Poly I:C, reinem RPE-Überstand und Überstand von mit Poly I:C aktiviertem RPE auf die Zytokin- und Enzymexpression von Monozyten.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die RPE-Zellen in Monozyten eine Herunterregulation der Expression von iNOS und COX2 induzieren. Wenn RPE-Zellen zuvor mit Poly I:C in Kontakt kommen, führt dies zu einer starken Reduktion der iNOS Expression. IL-1 β wird signifikant reduziert, wenn Poly I:C Konzentrationen von 1 μ g/ml eingesetzt werden. Eine Hochregulation der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, sowie des Zytokins IL-10 findet nicht statt (96).

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss mit TLR3-Agonisten aktiviertes retinales Pigmentepithel auf die Zytokin- und Enzymexpression von Monozyten hat. Ziel des Projektes war es, herauszufinden, ob Monozyten nach dem Kontakt mit RPE inflammatorische Eigenschaften entwickeln und so eine Entzündung unterhalten oder eher anti-inflammatorische Effekte ausüben. Die Auswahl der untersuchten Zytokine und Enzyme sollte zusätzlich Hinweis in Bezug auf mögliche angiogene oder anti-angiogene Eigenschaften der Monozyten liefern. Die Ergebnisse könnten neue Informationen über pathologische Prozesse im Rahmen retinaler Erkrankungen, insbesondere bei altersabhängiger Makuladegeneration liefern.

Untersucht wurden dabei Monozyten aus dem Blut frisch geschlachteter Schweine.

Mit der Ficoll-Dichtezentrifugation ist es in unserem Labor gelungen, eine kostengünstige und effektive Methode zur Präparation von Monozyten aus peripherem Schweineblut zu etablieren. Diese Präparation nach Berg et al. (97) wurde für diese Arbeit übernommen. Mehr als 95% der kultivierten Monozyten waren vital. Es gelang eine Reinheit von im Mittel über 92% zu erzielen. Auch bei der

Präparation der retinalen Pigmentepithelzellen aus den Augen von Schweinen konnte in dieser Arbeit auf ein an der Augenklinik Kiel seit Jahren etabliertes Verfahren zurückgegriffen werden. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten den typischen Zellverbund und Pigmentierung als Beweis für Vitalität.

Mit der quantitativen *real-time* PCR wurde in dieser Arbeit ein Verfahren genutzt, dass die Prinzipien einer einfachen Polymerase-Kettenreaktion nutzt und gleichzeitig eine Quantifizierung des amplifizierten Materials möglich macht. Eine zeitaufwendige gel-elektrophoretische Auftrennung der gewonnen DNA-Fragmente ist dabei nicht mehr notwendig. Der standardisierte Ablauf liefert immer gleiche Untersuchungsbedingungen. Zur Auswertung der gemessenen Daten wurde die relative Quantifizierung genutzt. Die Menge an gemessenem Genmaterial wird dabei mit der Menge an *housekeeping*-Genen verglichen (siehe Kapitel 2.2.11). Relative Quantifizierung ist im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung einfacher durchzuführen, da zur Berechnung keine Standardkurve benötigt wird (110). Da im Rahmen dieser Arbeit die absolute Genmenge nicht von Interesse war, um die Modulation der Zytokinexpression beurteilen zu können, stellte sich die relative Quantifizierung als Methode der Wahl dar.

Anders als in vielen vorangegangenen Arbeiten wurde in dieser Arbeit nicht wie weit verbreitet das Mausmodell genutzt, sondern auf Zellen des Schweines zurückgegriffen. Das angeborene Immunsystem von Schweinen, zu dem auch die Monozyten zählen zeigt viele Übereinstimmungen mit dem menschlichen Immunsystem. Im Gegensatz zu Mäusen ähnelt zum Beispiel die Verteilung von *Toll-like*-Rezeptoren auf den Zellen der Schweine sehr der Verteilung auf humanen Zellen (111). Die Aktivierbarkeit von porcinen Monozyten in vitro durch pro-inflammatorische Stimuli wurde bereits durch Facci et al gezeigt (111). In Bezug auf das Immunsystem zeigen Schweine außerdem Ähnlichkeiten im Aufbau der Immunglobuline. Die genetische Sequenz zeigt viele Übereinstimmungen zu humanen Immunglobulinen (112). Außer den vielen immunologischen Gemeinsamkeiten, gibt es weitere Argumente, die für den Gebrauch eines Schweinemodells sprechen. Die Anatomie des Auges ähnelt sehr dem des Menschen. Größe, Durchblutung und die Organisation der Retina zeigen viele Gemeinsamkeiten zum menschlichen Auge. Die Retina besteht aus 10 Schichten und ist vergleichbar dick (113), (114), (115). Eine

ethische Problematik lässt sich mit der Nutzung der Zellen des Schweines sehr einfach umgehen. Das genutzte Material ist Abfallprodukt während der Schlachtung. Kein Tier wurde aus wissenschaftlichem Interesse getötet.

Die erhobenen Daten ergeben, dass durch den humoralen Zellkontakt zwischen Monozyten und RPE keine TNF- α Induktion in den Monozyten stattfindet (siehe Abbildung 9). Bekannt ist bereits, dass die direkte Interaktion zwischen Monozyten und RPE durch vorrangigene Ausschüttung des FAS-Liganden aus den Monozyten zur Induktion von Apoptose in retinalen Pigmentepithelzellen führt (116). RPE Zellen sind allerdings einigermaßen resistent gegen durch den FAS-Liganden induzierten Zelltod, solange keine pro-inflammatorischen Zytokine wie zum Beispiel TNF- α das umgebende Milieu bestimmen (117). Die gewonnenen Daten dieser Arbeit unterstützen die Vermutung, dass durch die fehlende TNF- α Expression ein Milieu im Umfeld des retinalen Pigmentepithels aufrechterhalten wird, das Apoptose verhindert. Es konnte ebenfalls keine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 gemessen werden. Die TLR3-Aktivierung in RPE Zellen resultiert also insgesamt betrachtet nicht in einer pro-inflammatorischen Ausrichtung des Expressionsprofils der beteiligten Monozyten. Für IL-1 β konnte in der Gruppe der mit 1 μ g Poly I:C behandelten RPE-Zellen sogar eine signifikant reduzierte monozytäre Expression des Zytokins gemessen werden (siehe Abbildung 10). Hier findet somit keine Polarisierung der Monozyten zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp statt. Weiterführend konnte in dieser Arbeit keine Hochregulation der IL-10 Expression gemessen werden. Dies steht im Kontrast zu bereits publizierten Daten in einer Arbeit von Zamiri et al. Dort wurde am Mausmodell eine erhöhte Expression des IL-10 nach Behandlung mit Überständen von RPE-Zellen gemessen (118). Die Diskrepanz lässt sich vielleicht durch den unterschiedlichen genetischen Ursprung der in dieser Arbeit genutzten Monozyten erklären. Bei den Monozyten handelt es sich um primäre Zellen aus dem Schwein und nicht um Zellen einer Zelllinie. Bei Zellen einer Zelllinie handelt es sich um immortalisierte Zellen mit dem Ursprung aus einer Primärkultur. Bei der Nutzung von primären Zellen handelt es sich hingegen aus direkt aus dem Gewebe entnommenem Material von unterschiedlichen Individuen mit ebenso unterschiedlichen genetischen Grundlagen (119). Das Ergebnis der Arbeit von Apte et al. zeigt, dass IL-10 als möglicher pro-angiogener

Faktor im Krankheitsprozess der CNV beteiligt ist (24). Die hier aktuell bemerkte fehlende Hochregulation kann Hinweis darauf sein, dass RPE-Zellen die Ausbildung eines pro-angiogenen Phänotyps in Monozyten zu verhindern suchen, um retinale Funktionen aufrechtzuerhalten.

iNOS ist bekannt als wichtiger Faktor in der VEGF vermittelten choroidalen Neovaskularisation (86), (120). Die Feststellung, dass retinale Pigmentepithelzellen die iNOS Expression in Monozyten reduzieren (siehe Abbildung 13), unterstützt die These, dass RPE Zellen Monozyten nicht zur Ausbildung eines pro-angiogenen Phänotyps stimulieren, sondern dem entgegenwirken. Zusätzlich konnte die Messung der COX2- Expression nach Kontakt der Monozyten mit unstimuliertem RPE Überstand eine signifikante Reduktion aufweisen (siehe Abbildung 14). Auch COX2 ist ein Mitspieler in der VEGF-vermittelten choroidalen Neovaskularisation (92).

Die Aktivierung des TLR3-Rezeptors auf RPE-Zellen führt bei Mikroglia-Zellen zur Ausbildung eines pro-inflammatorischen Phänotyps (121). Die in diesem Projekt untersuchten Monozyten zeigten auf eine Behandlung mit den Überständen von TLR-3-aktiviertem retinalem Pigmentepithel jedoch ein entgegengesetztes Verhalten. Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α oder Interleukin-6 werden in Monozyten nicht vermehrt exprimiert. Die Expression von IL-1 β wird sogar signifikant reduziert, wenn das RPE mit einer Poly I:C Konzentration von 1 μ g/ml behandelt wird. Zusammen mit der Feststellung, dass die Ausschüttung von iNOS und COX2 signifikant reduziert wird, lässt sich postulieren, dass Monozyten im Gegensatz zu Mikroglia-Zellen nach Kontakt mit RPE-Zellen keinen pro-inflammatorischen Phänotyp aufweisen, die Expression pro-inflammatorischer Substanzen sogar reduzieren und auch keine pro-angiogene Aktivierung zeigen. Das retinale Pigmentepithel sorgt möglicherweise so nach viraler TLR3-Aktivierung dafür, dass Monozyten im Gesamtkonstrukt der ablaufenden Entzündungsreaktion keine pro-angiogenen Eigenschaften entwickeln, um die Auslösung einer choroidalen Neovaskularisation zu verhindern. Retinales Pigmentepithel hat somit zellspezifische Einflüsse in den komplexen immunologischen Abläufen. Die Ergebnisse beruhen jedoch bisher auf in vitro Versuchen. Eine Bestätigung in vivo steht noch aus.

Zu diskutieren sind die auffällig hohen Standardabweichungen in den gemessenen

Daten für die Zytokin- und Enzymexpression aus den Monozyten. Die Zellen sowohl des RPE als auch der Monozyten stammen aus genetisch unterschiedlichen Schweinen, die unter unsterilen, üblichen landwirtschaftlichen Verhältnissen gehalten wurden. Die Individuen sind nicht genetisch identisch und besitzen genau wie jeder einzelne Mensch ein unterschiedlich kompetentes Immunsystem. So ist sicher auch nicht auszuschließen, dass die kultivierten Monozyten zu Lebzeiten des Schweins bereits in Kontakt mit Pathogenen gekommen sind und eventuelle Vorinfektionen bestanden. Gerade diese Tatsache macht die ermittelten Daten relevant, da so die Patientensituation sehr viel näher abgebildet werden kann, als in vergleichbaren Arbeiten in denen immortalisierte Zelllinien als Modell genutzt wurden.

5 Zusammenfassung

Der altersabhängigen Makuladegeneration als führende Ursache für Erblindung in der industrialisierten Welt liegt eine multifaktorielle Genese zu Grunde. Bedeutender Faktor sind Entzündungsprozesse, die das Voranschreiten der Krankheit unterstützen. Zahlreiche Zellen und Botenstoffe sind an einer Immunreaktion beteiligt. Das retinale Pigmentepithel mit seiner anatomischen Position zwischen Photorezeptorzellen und Choriokapillaris ist ein wichtiger Vertreter des Immunsystems im Auge. Es exprimiert TLR3-Rezeptoren und Zytokine und kann nach Aktivierung in retinalen Mikrogliazellen die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen bewirken. Das Verhalten von Monozyten und ihre Reaktion auf Aktivierung durch RPE-Zellen sind bisher jedoch weitestgehend unklar gewesen.

In dieser Arbeit sollte die Zytokinexpression von Monozyten untersucht werden, nachdem diese mit dem Überstand von retinalen Pigmentepithelzellen in Kontakt gekommen sind. Die RPE-Zellen wurden dafür zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen des TLR3-Agonisten Poly I:C aktiviert. Dabei sollten die Fragen beantwortet werden, welchen Einfluss aktiviertes retinales Pigmentepithel auf die Zytokinexpression von Monozyten hat und ob die humorale Zellinteraktion eher zur Expression von pro-inflammatorischen Substanzen oder eines entzündungshemmenden Botenstoffes führt.

Als Ergebnis ist zu verzeichnen, dass die Aktivierung von Monozyten durch retinales

Pigmentepithel nicht zu einer Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Die Daten zeigen sogar eine verminderte Expression von IL-1 β . Ebenfalls reduzierte Werte konnten für die Enzyme COX2 und iNOS gemessen werden, was darauf hindeutet, dass aktiviertes RPE auch keine pro-angiogen Effekte in Monozyten induziert, sondern im Gegenteil diese eher unterdrückt. Das retinale Pigmentepithel spielt eine regulierende Rolle im Gleichgewicht und in der Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Milieus im Auge. Es hat bedeutenden zellspezifischen Einfluss auf die an einer Entzündungsreaktion beteiligten Zellen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Detrick B., Hooks J. J.** Immune regulation in the retina. *Immunol Res.* (2010), 1-3:153-161.
2. **Hageman G.S., Luthert P.J., Victor Chong N.H., Johnson L.V., Anderson D.H., Mullins R.F.** An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* (2001), 20(6):705-732.
3. **Kellner U., Wachtlin J.** *Retina. Diagnostik und Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts.* Stuttgart : Thieme Verlag, (2008).
4. **Miller, J.W.** Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle. *Am J Ophthalmol.* (2013), 155(1):1-35.e13.
5. **Hageman G.S., Mullins R.F.** Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Mol Vis.* (1999), 5:28.
6. **Johnson L.V., Ozaki S., Staples M.K., Erickson P.A., Anderson, D.H.** A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res.* (2000), 70(4):441-449.
7. **Blaauwgeers H.G., Holtkamp G.M., Rutten H., Witmer A.N., Koolwijk P., Partanen T.A., Alitalo K., Kroon M.E., Kijlstra A., van Hinsbergh V.W., Schlingemann R.O.** Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol.* (1999), 155(2):421-428.
8. **Yang Z., et al.** Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* (2008), 359(14):1456-1463.
9. **Sarks J.P., Sarks S.H., Killingsworth M.C.** Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye (Lond).* 1988, 2 (Pt 5):552-77.

10. **Garner, A.** *Pathobiology of ocular disease*. New York : s.n., (1994). 1625–1710.
11. **Ramrattan R.S., van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., Mulder P.G., de Jong P.T.** Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (1994), 35(6):2857-2864.
12. **Klein R., Peto T., Bird A., Vannewkirk M.R.** The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. (2004), 137(3):486-495.
13. **Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. (1992), 359(6398):843-845.
14. **Ferrara, N.** Vascular endothelial growth factor: basic science. *Endocr Rev*. (2004), 25:581–611.
15. **Miller D.W., Joussen A.M., Holz F.G.** Die molekularen Mechanismen der neovaskulären AMD. *Ophthalmologe*. (2003), 2:92-96.
16. **Handa J.T., Verzijl N., Matsunaga H., Aotaki-Keen A., Luttj G.A., te Koppele J.M., Miyata T., Hjelmeland L.M.** Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (1999), 40(3):775-779.
17. **Shi Y.Y., Wang Y.S., Zhang Z.X., Cai Y., Zhou J., Hou H.Y., van Rooijen N.** Monocyte/macrophages promote vasculogenesis in choroidal neovascularization in mice by stimulating SDF-1 expression in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. (2011), 249(11):1667-1679.
18. **Liu J., Copland D.A., Horie S., Wu W.K., Chen M., Xu Y., Paul Morgan B, Mack M., Xu H., Nicholson L.B., Dick A.D.** Myeloid cells expressing VEGF and arginase-1 following uptake of damaged retinal pigment epithelium suggests potential mechanism that drives the onset of choroidal angiogenesis in mice. *PLoS*. (2013), 8(8):e72935.

19. **Krzystolik M.G., Afshari M.A., Adamis A.P., et al.** Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol.* (2002), 120:338–346.
20. **Grisanti, S.** Das Immunprivileg des Auges. *Der Ophthalmologe.* (1998), 2:124-135.
21. **Klettner, A.** The retinal pigment epithelium in the immun regulation of the retina. *Retinal Pigment Epithelium: Anatomy, Function and Disease.* Hauppauge NY : Nova Publishers, 2014.
22. **Benhar I., London A., Schwartz M.** The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. *Front immunol.* (2012), 3:296.
23. **Espinosa-Heidman D.G., Suner I.J., Hernandez E.P., Monroy D., Csaky K.G., Cousins S.W.** Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2003), 44(8):3586-3592.
24. **Apte R.S., Richter J., Herndon J., Ferguson T.A.** Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS .* (2006), 3(8):e310.
25. **Detrick B., Rodrigues M., Chan C.C., Tso M.O., Hooks, J.J.** Expression of HLA-DR antigen on retinal pigment epithelial cells in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol.* (1996), 5:584-590.
26. **Finneman, S.C.** Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* (2003), 22(16):4143-4154.
27. **Adamis A.P., Shima D.T., Yeo K.T., Yeo T.K., Brown L.F., Berse B., D'Amore P.A., Folkman, J.** Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (1993), 193(2):631-638.

28. **Lutty G., Grunwald J., Majji A.B., Uyama M., Yoneya S.** Changes in choriocapillaris, retinal pigment epithelium in age related macular degeneration. *Mol Vis.* (1999), 5:35.
29. **Strauss, O.** The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* (2005), 85(3):845-881.
30. **Kim Y.H., He S., Kase S., Kitamura M., Ryan S.J., Hinton D.R.** Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* . (2009), 247(5):651-659. doi: 10.1007/s00417-009-1049-y. Epub 2009 Feb 13.
31. **Bian Z.M., Elner S.G., Yoshida A., Elner V.M.** Human RPE-monocyte co-culture induces chemokine gene expression through activation of MAPK and NIK cascade. *Exp eye res.* (2003), 76(5):573-583.
32. **Huemer H.P., Larcher C. Kirchebner W., Klingenschmid J., Göttinger W., Irschick E.U.** Susceptibility of human retinal pigment epithelial cells to different viruses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (1996), 234(3):177-185.
33. **Klettner A., Koinzer S., Meyer T., Roider J.** Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells - Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta ophthalmologica.* 2013, (3):e211-8.
34. **Cousins SW1, Espinosa-Heidmann DG, Miller D.M., Pereira-Simon S., Hernandez E.P., Chien H., Meier-Jewett C., Dix R.D.** Macrophage activation associated with chronic murine cytomegalovirus infection results in more severe experimental choroidal neovascularization. *PLoS Pathog.* 2012, 8(4):e1002671. doi: 10.1371/journal.ppat.1002671.
35. **Sun D., Enzmann V., Lei S., Sun S.L., Kaplan H.J., Shao H.** Retinal pigment epithelial cells activate uveitogenic T cells when they express high levels of MHC class II molecules, but inhibit T cell activation when they express restricted levels. *J Neuroimmunol.* . (2003), 144(1-2):1-8.

36. **Chen S., Yan H., Sun. B., Zuo A., Liang D.** Subretinal transfection of chitosan-loaded TLR3-siRNA for the treatment of experimental autoimmune uveitis. *Eur J Pharm Biopharm.* (2013), 85(3 Pt A):726-735. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.09.005. Epub 2013 Sep 17.
37. **Ebihara N., Chen L., Tokura T., Ushio H., Iwatsu M., Murakami A.** Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* (2007), 39(3):155-63. Epub 2007 May 25.
38. **Liversidge J., McKay D., Mullen G., Forrester J.V.** Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE2 and membrane-bound mechanisms. *Cell Immunol.* . (1993), 149(2):315-330.
39. **Redfern R.L., McDermott A.M.** Toll-like receptors in ocular surface disease. *Exp Eye Res.* (2010), 90(6):679-687.
40. **Chang J.H., McCluskey P.J., Wakefield D.** Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory disease. *Br J Ophthalmol.* . (2006), 90:103-108.
41. **Takeda K., Kaisho T., Akira S.** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* (2003), 21:335-376.
42. **Kindzelskii A.L., Elner V.M., Elner S.G., Yang D., Hughes B.A., Petty H.R.** Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. *J Gen Physiol.* . (2004), 124(2):139-149.
43. **de Bouteiller O., Merck E., Hasan U.A., Hubac S., Benguigui B., Trinchieri G., Bates E.E., Caux C.** Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem.* (2005), 280(46):38133-38145.
44. **Vercammen E., Staal J., Beyaert, R.** Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev.* (2008), 21(1):13-25. doi:

10.1128/CMR.00022-07.

45. **Karikó K., Ni H., Capodici J., Lamphier M., Weissman D.** mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* . (2004), 279(13):12542-12550. Epub 2004 Jan 16.
46. **Alexopoulou L., Czopik Holt A., Medzhitov R., Flavell R.A.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-KB by Toll-like receptor 3. *Nature.* (2001), 413(6857):732-738.
47. **Kumar M.V., Nagineni C.N., Chin M.S., Hooks J.J., Detrick B.** Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol.* . (2004), 153(1-2):7-15.
48. **Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* (1998), 273(46):30336-43.
49. **Pisegna S., Pirozzi G., Piccoli M., Frati L., Santoni A., Palmieri G.** p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood.* (2004), 104(13):4157-64. Epub 2004 Aug 17.
50. **Böcker W., Denk H., Heitz Ph. U.** *Pathologie.* München : Urban & Fischer, (2001).
51. **Nakao S., Kuwano T., Tsutsumi-Miyahara C., Ueda S., Kimura Y.N., Hamano S., Sonoda K.H., Saijo Y., Nukiwa T., Strieter R.M., Ishibashi T., Kuwano M., Ono M.** Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest.* (2005), 115(11):2979-2991.
52. **Ambati J., Anand A., Fernandez S., Sakurai E., Lynn B.C., Kuziel W.A., Rollins, B.J., Ambati, B.K.** An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nature.* (2003), 9(11):1390-1397.

53. **Mantovania A., Sicab A., Sozzanib S., Allavenab P., Vecchib A., Locatia M.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* (2004), 25(12):677-686.
54. **Osuský R., Malik P., Aurora Y., Ryan S.J.** Monocyte-macrophage differentiation induced by coculture of retinal pigment epithelium cells with monocytes. *Ophthalm Res.* (1997), 29(3):124-129.
55. **Wynn T.A., Chawla A., Pollard, J.W.** Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* (2013), 496(7446):445-455.
56. **Martin M., Resch K.** *Immunologie.* Stuttgart : UTB, (2009).
57. **Murphy K., Travers P., Walport M.** *Janeway Immunologie.* Berlin : Springer Spektrum, (2009).
58. **Rahman M.M., McFadden G.** Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PloS* . (2006), 2(2), e4.
59. **Oh H., Takagi H., Takagi C., Suzuma K., Otani A., Ishida K., Matsumura M., Ogura Y., Honda Y.** The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1999), 40(9):1891-1898.
60. **Chen M., Forrester J.V., Xu H.** Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res.* (2007), 84(4):635-45.
61. **Cousins S.W., Espinosa-Heidmann D.G., Csaky K.G.** Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch Ophthalmol.* (2004), 122(7):1013-8.
62. **Dasu M.R., Devaraj S., Jialal, I.** High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2007), 293(1):E337346.

63. **Liu Y., Biarnés Costa M., Gerhardinger C.** IL-1 β is upregulated in the diabetic retina and retinal vessels: cell-specific effect of high glucose and IL-1 β autostimulation. *PLoS*. (2012), 7(5):e36949.
64. **Elmqvist J.K., Scammell T.E., Saper C.B.** Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci.* (1997), 20(12):565-570.
65. **Hori, T.** Cytokines and fever. *Jpn J Med.* (1991), 30(6):609-611.
66. **Diehl S., Rincón M.** The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol.* (2002), 39(9):531-536.
67. **Waldner M.J., Neurath M.F.** Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol.* (2014), 26(1):75-79.
68. **Waldner M.J., Wirtz S., Jefremow A., Warntjen M., Neufert C., Atreya R., Becker C., Weigmann B., Vieth M., Rose-John S., Neurath M.F.** VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J Exp Med.* (2010), 207(13):2855-2868.
69. **Seddon J.M., George S., Rosner B., Rifai N.** Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch Ophthalmol.* (2005), 123(6):774-782.
70. **Jones S.A., Scheller J., Rose-John S.** Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest.* (2011), 121(9):337533-337583.
71. **Hirano, T.** Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol.* . (1998), 16(3-4):249-484.
72. **de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E.** Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* (1991), 174(5):1209-1220.

73. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robets K., Walter P.** *Molecular biology of the cell*. s.l. : Garland Science, (2008).
74. **Schmidt R.F., Lang F.** *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Berlin : Springer, (2007).
75. **Iadecola C., Ross M.E.** Molecular Pathology of Cerebral Ischemia: Delayed Gene Expression and Strategies for Neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* (1997), 835:203-217.
76. **Chao C.C., Hu S., Ehrlich L., Peterson P.K.** Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun.* 1995, 9(4):355-65.
77. **Iadecola C., Zhang F., Xu X.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol.* 1995, 268(1 Pt 2):R286-92.
78. **Iadecola C., Zhang F., Casey R., Nagayama M., Ross M.E.** Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci.* 1997, 17(23):9157-64.
79. **Cooke J.P., Losordo D.W.** Nitric Oxide and Angiogenesis. *Circulation.* (2002), 105(18):2133-2155.
80. **Hood J.D., Meininger C.J., Ziche M., Granger H.J.** VEGF upregulates ecNOS message, protein and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* (1998), 274(3 Pt 2):H1054-1058.
81. **van der Zee R., Murohara T., Luo Z., Zollman F., Passeri J., Lekutat C., Isner J.M.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* (1997), 95(4):1030-1037.
82. **Babaei S., Teichert-Kuliszewska K., Monge J.C., Mohamed F., Bendeck M.P., Stewart D.J.** Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast

growth factor. *Circ res.* (1998), 82(9):1007-1015.

83. **Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J.A., Sessa W.C.** Nitric oxide production contributes to the angiogenetic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* (1997), 100(12):3131-3139.

84. **Dimmeler S., Hermann C., Galle J., Zeiher A.M.** Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* . (1999), 19(3):656-664.

85. **Hudlicka, O.** Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation.* (1998), 5(1):7-23.

86. **Ando A., Yang A., Mori K., Yamada H., Yamada E., Takahashi K., Saikia J., Kim M., Melia M., Fishman M., Huang P., Campochiaro P.A.** Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol.* (2002), 191(1):116-124.

87. **Simmons D.L., Botting R.M., Hla T.** Cyclooxygenase isoenzymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* (2004), 56(3):387-437.

88. **Prostaglandin-Endoperoxidase Synthase 2. [Online]**
<http://omim.org/entry/600262>.

89. **Swierkosz T.A., Mitchell J.A., Warner T.D., Botting R.M., Vane J.R.** Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol.* (1995), 114(7):1335-1342.

90. **Ershov A.V., Bazan N.G.** Induction of cyclooxygenase-2 gene expression in retinal pigment epithelium cells by photoreceptor rod outer segment phagocytosis and growth factors. *J Neurosci Res.* (1999), 58(2):254-261.

91. **Tsujii M., Kawano S., Tsujii S., Sawaok H., Hori M., DuBois R.N.** Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* (1998), 93(5):705-716.

92. **Houssier M., Raoul W., Lavalette S., Keller N., Guillonneau X., Baragatti B., Jonet L., Jeanny J.C., Behar-Cohen F., Coceani F., Scherman D., Lachapelle P., Ong H., Chemtob S., Sennlaub F.** CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS* . (2008), 5(2):e39.
93. **Nadda N., Vaish V., Setia S., Sanyal S.N.** Angiostatic role of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Biomed Pharmacother*. (2010), 66(6):474-483.
94. **Machado D.E., a Plinio Tostes B., Gama Landgraf R., Dias Fernandes P., Palmero C., Alves L.M., Simoes Abrao M., Nasciutti L.E.** A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril*. (2010), 93(8):2674-2679.
95. **Sennlaub F., Valamanesh F., Vazquez-Tello A., El-Asrar A.M., Checchin D., Brault S., Gobeil F., Beauchamp M.H., Mwaikambo B., Courtois Y., Geboes K., Varma D.R., Lachapelle P., Ong H., Behar-Cohen F., Chemtob S.** Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation*. (2003), 108(2):198-204.
96. **Hettich C., Wilker S., Mentlein R., Lucius R., Roeder J., Klettner A.** The retinal pigment epithelium (RPE) induces FasL and reduces iNOS and Cox2 in primary monocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. (2014), 252(11):1747-1754.
97. **Berg C., Wilker S., Roeder J., Klettner A.** Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method. *Vet res commun*. (2013), 37(3):239-241.
98. **Brown M., Wittwer C.** Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinl chem*. (2000), 46(8 Pt 2):1221-1229.
99. **Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.** *Der Experimentator, Immunologie*. Berlin : Springer Spektrum, (2009).
100. **Wiencke A.K., Kiilgaard J.F., Nicolini J., Bundgaard M., Röpke C., La Cour M.** Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand*.

(2003), (2):170-176.

101. **Richert, E.D.** Einfluss der Hemmung des VEGF-Signalwegs auf die Expression des VEGF-Rezeptors II und weiterer relevanter Proteine. Kiel : s.n., (2011).

102. **Klettner A., Roider J.** Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib In Vitro: Efficiency and Possible Additional Pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2008), 49(10):4523-4527.

103. **Chomczynski P., Sacchi, N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* (1987), 162(1):156-159.

104. **Kiel, Anatomisches Institut der Christian-Albrechts-Universität.** Allgemeine Materialien und Methoden.

105. **Mülhardt, C.** Methoden der RNA-Isolierung. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics.* Berlin : Springer, (2009).

106. **Heptinstall J., Rapley R.** Spectrophotometric analysis of nucleic acids. *Nucleic Acid Protocols Handbook.* Berlin : Springer, (2000).

107. **Mülhardt, C.** Reverse Transkription (cDNA-Synthese). *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics.* Berlin : Springer, (2013).

108. **Theophilus, B.D.M.** Principals and medical applications of the polymerase chain reaction. [Buchverf.] Rapley, R. Walker J.M. *Molecular Biomethods Handbook.* s.l. : Humana Press, (2008).

109. **Sugden D., de Winter P.** Quantification of mRNA Using Real Time RT-PCR. [Buchverf.] Rapley R. Walker J.M. *Molecular Biomethods Handbook.* New York City : Humana Press, (2008).

110. **Livak K.J., Schmittgen T.D.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* (2001), 25(4):402-408.

111. **Facci M.R., Auray G., Buchanan R., van Kessel J., Thompson D.R., Mackenzie-Dyck S., Babiuk L.A., Gerdts V.** A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. *Immunology*. (2010), 129(3):396-405.
112. **Butler J.E., Sun J., Wertz N., Sinkora M.** Antibody repertoire development in swine. *Dev Comp Immunol*. (2006), 30(1-2):199-221.
113. **Lassota, N.** Clinical and histological aspects of CNV formation: studies in an animal model. *Acta Ophthalmol*. (2008), 86 Thesis 2, 1-24.
114. **Sanchez I., Martin R., Ussa F., Fernandez-Bueno I.** The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. (2011), 249(4):475-482.
115. **Middleton, S.** Porcine ophthalmology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. (2010), 26(3):557-572.
116. **Yoshida A., Elner S.G., Bian Z.M., Kindezelskii A.L., Petty H.R., Elner V.M.** Activated monocytes induce human retinal pigment epithelial cell apoptosis through caspase-3 activation. *Lab Invest*. (2003), 83(8):1117-1129.
117. **Esser P., Heimann K., Abts H., Fontana A., Weller M.** CD95 (Fas/APO-1) antibody-mediated apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. (1995), 213(3):1026-1034.
118. **Zamiri P., Masli S., Kitaichi N., Taylor AW., Streilein J.W.** Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Ocul Immunol Inflamm.* . (2007), 15(3):279-294.
119. **Schmitz, S.** *Der Experimentator: Zellkultur*. Berlin : Springer Verlag, (2009).
120. **Ando A., Yang A., Nambu H., Campochiaro P.A.** Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol Pharmacol*. (2002), 62(3):539-544.
121. **Klettner A., Hamann T., Schlüter K., Lucius R., Roeder J.** Retinal pigment

epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. *Acta Ophthalmol.* (2014), 92(8):e621-629.

7 Anhang

7.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel:

„EINFLUSS VON AKTIVIERTEM RETINALEN PIGMENTEPITHEL AUF DIE ZYTOKINEXPRESSSION VON MONOZYTEN“

selbständig verfasst und keine, außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln, verwendet zu haben. Ich versichere alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten Anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde. Die Dissertation lag weder in dieser noch in einer anderen Fassung einer anderen Fakultät vor. Unterstützt und wissenschaftlich betreut wurde ich während dieser Arbeit durch Frau Prof. Dr. Alexa Klettner.

Sebastian Wilker

Georgsmarienhütte, den.....

7.2 Veröffentlichungen

7.2.1 Kongressbeiträge

„Modulation der Zytokinausschüttung von Monozyten durch TLR-3 aktiviertes retinales Pigmentepithel“; Kurzvortrag; 63. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte am 31. Mai und 1. Juni 2013 in Westerland auf Sylt.

7.2.2 Artikel in Zeitschriften

„Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method.“; Berg, C.; Wilker, S.; Roider, J.; Klettner, A.; 2013; Veterinary research communication; 37(3):239-241.

„The retinal pigment epithelium (RPE) induces FasL and reduces iNOS and Cox2 in primary monocytes.“; Hettich, C.; Wilker, S.; Mentlein, R.; Lucius, R.; Roider, J.; Klettner, A.; 2014; Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology.; 252(11):1747-1754

7.3 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Johann Roider, dem Direktor der Augenklinik am UKSH Kiel, für die Möglichkeit im Labor seines Institutes die erforderlichen Arbeiten durchzuführen.

Frau Prof. Dr. Alexa Klettner möchte ich für die freundliche Bereitstellung des Themas dieser Dissertationsschrift und die beispielhafte, professionelle Betreuung über die gesamte Zeit danken. Frau Prof. Dr. Klettner war zu jeder Zeit bereit, Hilfestellung zu leisten und in der Lage auch in anspruchsvollen, schwierigen Abschnitten der Arbeit zu motivieren. Als besonders konstruktiv möchte ich hierbei die regelmäßig stattfindenden Doktorandenseminare erwähnen, die auch über das Thema der eigenen Doktorarbeit hinaus hilfreiche Informationen zum wissenschaftlichen Arbeiten lieferten.

Ebenfalls zu außerordentlichem Dank bin ich außerdem Frau Christine Berg verpflichtet. Sie hat mich in mühevoller und geduldiger Art und Weise in die Monozytenpräparation eingearbeitet. Dieses Engagement hat sicherlich entscheidend zum Gelingen der Arbeit und den guten Ergebnissen in diesem Teilabschnitt des Projektes beigetragen.

Ich danke allen wissenschaftlichen Mitarbeiter des Labors der Augenklinik, insbesondere Frau Serap Luick, Frau Monika Marquardt und Frau Elisabeth Richert. Sie waren neben dem aufwendigen Tagesgeschäft und den anfallenden Routinearbeiten jeder Zeit mit ihrer Erfahrung unterstützend an meiner Seite. Ich konnte viele praktische Fertigkeiten im Umgang mit Labormaterialien und Geräten von ihnen lernen.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius und allen Mitarbeiter des Anatomischen Institutes der Christian Albrechts-Universität zu Kiel. Frau Regine Worm, Frau Monika Grell und Herr Günther Schäfer arbeiteten mich in das Verfahren der Realtime-PCR ein. Auch hier konnte ich von ihrer langjährigen Erfahrung profitieren. Sie waren sowohl persönlich als auch telefonisch oder per *e-mail* schnell erreichbar und konnten oft innerhalb kurzer Zeit Fragen beantworten oder fehlendes Informationsmaterial zur Verfügung stellen.

Bei Dr. Stefan Kratzenstein bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Lösung

von Formatierungsfehlern in der optischen Präsentation dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern sowohl für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Doktorandenzeit als auch für die aufbauenden Worte bei kleinen Rückschritten und den festen Glauben an meine Person und den erfolgreichen Abschluss der Dissertation. An dieser Stelle danke ich all meinen Freunden, die mich in dieser Zeit begleitet haben und für Abwechslung und Ausgleich gesorgt haben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Freundin Uta van Goer. Sie hat durch die bedingungslose Unterstützung, Zusprache und Geduld besonders in Zeiten, in denen das Ziel der Dissertation noch in weiter Ferne lag, geholfen mich zu motivieren und damit einen großen Anteil am erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Aug. 2012	14 Tage Diagnostische Radiologie Universitätsklinik Kiel
Sept. 2012	14 Tage Gemeinschaftspraxis für Anästhesie, Schönberger Str., Kiel
Feb. / März 2013	21 Tage Nephrologisches Zentrum Sedanstraße, Kiel
März 2013	21 Tage Anästhesie St. Franziskus-Hospital, Münster

Praktisches Jahr

Aug. 2014 – Dez. 2014	Chirurgie FEK Neumünster
Dez. 2014 – April 2014	Innere Medizin imland Klinik Rendsburg
April 2014 – Juli 2014	Anästhesie Universitätsklinik Kiel

Ärztliche Tätigkeit

Jan. 2015 – April 2017	Assistenzarzt für Anästhesie an der imland Klinik Rendsburg
Seit 01. Mai 2017	Assistenzarzt für Anästhesie und Intensivmedizin am Marienhospital Osnabrück

Georgsmarienhütte, 10.12.2017

Sebastian Wilker